

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Etude du phénotype des souris knock-out pour le gène Maged2

Delimoy, Marie

*Award date:*  
2004

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



---

**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Etude du phénotype des souris « knock-out » pour le gène *Maged2***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
licenciée en Sciences biologiques**

Marie DELIMOY

Septembre 2004

## Etude du phénotype des souris « knock-out » pour le gène *Maged2*

DELIMOY Marie

### Résumé

Les gènes *MAGE* constituent de grandes familles multigéniques dans le génome des mammifères. En fonction de leur profil d'expression, on peut classer ces gènes en deux grandes catégories. Les gènes de la première catégorie (type I) ne sont pas exprimés dans les tissus normaux (non-tumoraux), à l'exception des cellules de la lignée germinale mâle, et parfois du placenta. Dans certaines tumeurs, l'expression de ces gènes de type I peut être activée, ce qui génère l'apparition d'antigènes. Les gènes *MAGE* de la deuxième catégorie (type II) sont, au contraire, exprimés dans de nombreux tissus non-tumoraux, tant chez l'adulte qu'au cours du développement. Notre laboratoire étudie en particulier les gènes de type II de la sous-famille *MAGED*. La conservation des gènes *MAGED* et de *MAGED2* en particulier, indique que les protéines qu'ils spécifient subissent une pression de sélection et remplissent donc vraisemblablement une fonction importante. Afin d'étudier le rôle de *Maged2* in vivo, notre laboratoire a généré des souris déficientes pour ce gène. Les premières observations réalisées sur des animaux homozygotes de fond génétique mixte (129SV-BALB/C-CD1) ont montré une mortalité périnatale et embryonnaire chez 30% des mutants. Cette mortalité serait la conséquence d'hémorragies observables chez les nouveau-nés et les embryons. Avec l'objectif d'augmenter la pénétrance – et potentiellement l'expressivité – du phénotype, nous avons transféré la mutation par croisements en retours successifs dans un fond génétique pur (C57/B16/J). Un déficit plus important en animaux déficients en *Maged2* a été observé (70% par rapport à 30%). Les mutants présentaient des hémorragies et de l'anémie. Un examen histologique du cœur et des reins, aux stades E14.5, E18.5 et P0 n'a pas révélé d'anomalie chez les mutants. Nous avons également examiné, par immunohistochimie, les composantes endothéliales et musculaires du système vasculaire aux stades E14.5 et E16.5. Ces études n'ont pas révélé d'anomalies chez les mutants. En conclusion, la cause de la mortalité liée à une déficience en *Maged2* reste à déterminer.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 2004

Promoteur: O. De Backer



*Je remercie particulièrement*

*Mr De backer, mon promoteur, de m'avoir accueillie dans son équipe et suivie au cours de ce mémoire,*

*Catherine, ma tutrice de m'avoir guidée et pour ses bons conseils,*

*Carlos, Matthieu, Dominique et Christiane pour leur aide quotidienne et leur soutien,*

*Le département d'histologie, pour leur accueil, leur aide indispensable à la réalisation de mon mémoire et tout le temps qu'ils m'ont consacré,*

*Mes parents, pour m'avoir permis d'entreprendre les études que j'aimais et pour leur soutien pendant ces quatre années, ainsi que ma grand-mère pour son aide précieuse et son intérêt à mon travail,*

*Mes amis, et plus particulièrement, mes amis proches pour les moments de fête et leur présence cette dernière année, Marie-Lise, Jérôme, Dimitri, Mamali, Vanessa et Julie,*

*Enfin, Laurent pour son soutien et ses encouragements.*



E14.5 : 14<sup>ème</sup> jour embryonnaire  
P0 : jour post-natal 0, jour de la naissance

ISH : Hybridation *in situ*

Kb : kilo bases

Mâles hémizygotes : mâles déficients en *Maged2*

Mage : protéine

*Mage* : gène

MAGE : protéine humaine

Mage : protéine murine

MCD : *Mage conserved domain*

NGF : *Nerve growth Factor*

PWS : Syndrome de Prader-Willi

Souris *Inbred* : souris de lignée pure. Ici, désigne les souris C57/B16/J issues du back-cross

Souris *Outbred* : Premières souris déficientes en *Maged2* à avoir été générées

Trk : Tyrosine kinase

# **Table des matières**



**1. Introduction..... 3**

<b>1. Les gènes MAGE.....</b>	<b>- 3 -</b>
1.1. Généralités .....	- 3 -
1.2. Classification des gènes <i>MAGE</i> en fonction de leur profil d'expression et de leur structure.....	- 4 -
1.2.1 Les gènes <i>Mage</i> de type I .....	- 4 -
1.2.2 Les gènes <i>MAGE</i> de type II.....	- 5 -
1.2.2.1 <i>NECDIN</i> .....	- 5 -
1.2.2.2 Les gènes <i>MAGED</i> .....	- 6 -
1.3. Evolution des gènes <i>Mage</i> .....	- 11 -
<b>2. Travaux réalisés antérieurement au laboratoire.....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>3. Hémorragies, pâleur ou mortalité périnatale causées par des mutations chez la souris -</b>	<b>15 -</b>
<b>4. But du mémoire.....</b>	<b>- 20 -</b>

**2. Résultats, discussion et perspectives..... 22**

<b>1. Transfert de la mutation <i>Maged2</i> dans la lignée C57/Bl6/J .....</b>	<b>- 22 -</b>
<b>2. Examen macroscopique des souris mâles hémizygotes pour la mutation <i>Maged2</i> .....</b>	<b>- 24 -</b>
2.1. Analyse de la viabilité des souris mâles hémizygotes pour la mutation <i>Maged2</i> .....	- 24 -
2.2. Phénotypes observables à la naissance des souris mâles hémizygotes pour la mutation <i>Maged2</i> -	25 -
2.3. Discussion .....	- 26 -
<b>3. Recherche d'anomalies vasculaires .....</b>	<b>- 27 -</b>
3.1. Etude histologique.....	- 27 -
3.1.1. Analyse histologique du rein .....	- 27 -
3.1.1.1. Le rein embryonnaire .....	- 28 -
3.1.1.2. Le rein de nouveau-nés.....	- 28 -
3.1.2. Analyse histologique du cœur .....	- 28 -
3.1.2.1. Le cœur embryonnaire .....	- 28 -
3.1.2.2. Le cœur de nouveau-nés .....	- 28 -
3.1.3. Discussion.....	- 29 -
3.2. Etude immunohistochimique .....	- 33 -
3.2.1. Analyse des cellules endothéliales.....	- 35 -
3.2.1.1. Etude des cellules endothéliales embryonnaires .....	- 35 -
3.2.1.2. Etude des cellules endothéliales de nouveau-nés .....	- 35 -
3.2.1.3. Discussion .....	- 36 -
3.2.2. Analyse des cellules musculaires lisses vasculaires .....	- 39 -
3.2.2.1. Etude des cellules musculaires lisses embryonnaires .....	- 39 -
3.2.2.2. Etude des cellules musculaires lisses de nouveau-nés .....	- 39 -
2.2.2.3. Discussion .....	- 40 -
<b>4. Conclusion et perspectives.....</b>	<b>- 43 -</b>



<b>3. Matériel et Méthodes.....</b>	<b>45</b>
1. Elevage des souris.....	- 45 -
2. Géotypage des souris.....	- 45 -
2.1. Extraction d'ADN des queues de souris .....	- 45 -
2.2. PCR.....	- 45 -
3. Techniques histologiques .....	- 47 -
3.1. Préparation des tissus .....	- 47 -
3.2. Microtomisation.....	- 48 -
3.3. Coloration Hémalum, Erythrosine, Safran .....	- 48 -
3.4. Marquage des cellules endothéliales grâce à un anticorps anti-CD-31 .....	- 49 -
3.5. Marquage des cellules musculaires lisses grâce à un anti-corps anti- $\alpha$ actine .....	- 50 -
4. Western Blot .....	- 51 -
4.1. Lysats protéiques et SDS PAGE .....	- 51 -
4.2. Transfert.....	- 51 -
4.3. Révélation .....	- 51 -
<b>4. Références bibliographiques.....</b>	<b>54</b>



# **Introduction**



## 1. Les gènes *MAGE*

### 1.1. Généralités

C'est en 1991 que les chercheurs de l'Institut Ludwig de Bruxelles identifient le premier gène *MAGE* humain. Ils l'appellent *MAGE* pour *Melanoma Associated antiGEn* en raison de son expression dans une lignée cellulaire de mélanome [Van der Bruggen *et al.*, 1991].

Ce gène fait partie d'une famille de 12 gènes, les gènes *MAGEA* situés dans la région q27-28 du chromosome X.

Le séquençage de la région p21 du chromosome X conduisit à la découverte d'un deuxième groupe de gènes *MAGE* : les gènes *MAGEB* [Muscatelli *et al.*, 1995]. Plus tard, toujours sur le chromosome X mais dans la partie q26-27 on identifia un troisième groupe : les gènes *MAGEC* [Lucas *et al.*, 1998 ; Lucas *et al.*, 2000].

Grâce au séquençage complet du génome humain, on sait désormais que celui-ci contient un total de 55 gènes *MAGE* classés en 13 sous-familles (Figure 1).

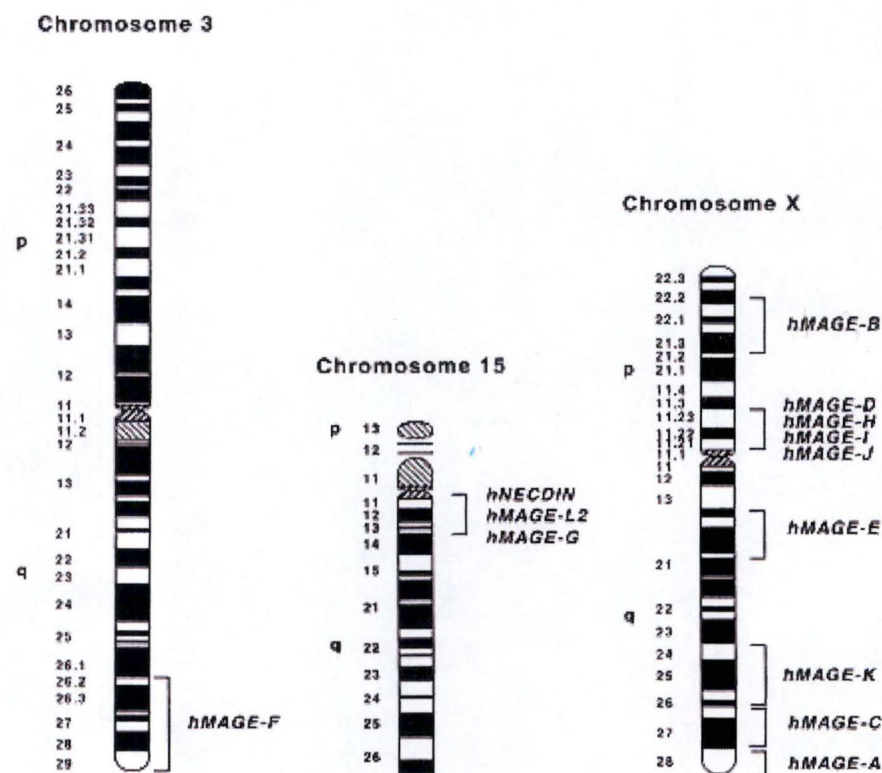


Figure 1. Localisation chromosomique des sous-familles de gènes *MAGE* humains [Chomez *et al.*, 2001].

Toutes les protéines *MAGE* partagent un domaine d'environ 200 acides aminés appelé « Mage Conserved Domain » (MCD). Ce domaine est habituellement situé près de l'extrémité carboxy-terminale (Figure 2). Le domaine amino-terminal est très variable d'une sous-famille à l'autre [Chomez, De Backer *et al.*, 2001].



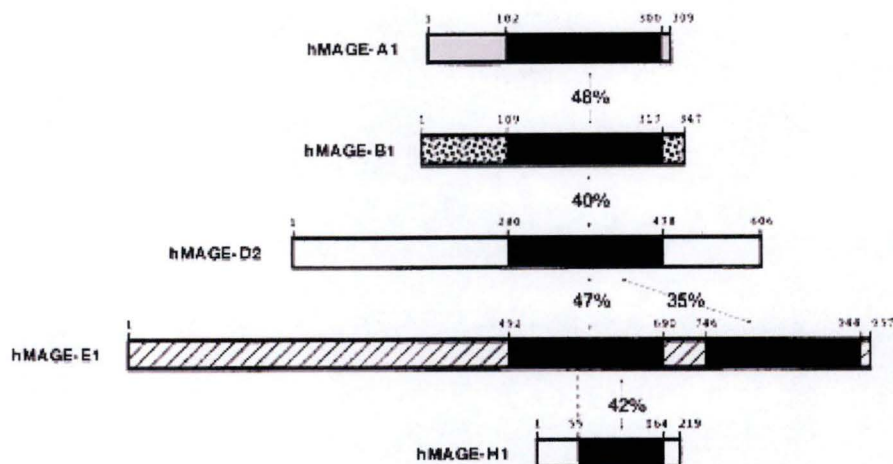


Figure 2. Représentation schématique des protéines MAGE humaines. Le rectangle noir représente le domaine d'homologie; le pourcentage d'identité d'acides aminés entre ces différents domaines est renseigné. [Chomez *et al.*, 2001]

Le génome de la souris contient 31 gènes *Mage* classés en 11 sous-familles [Chomez *et al.*, 2001].

## 1.2. Classification des gènes *MAGE* en fonction de leur profil d'expression et de leur structure

Les gènes *MAGE* peuvent être classés en deux catégories suivant leur profil d'expression. Le premier groupe (gènes *MAGE* de type I) comprend les gènes *MAGEA* (12 gènes), *B* (3 gènes) et *C* (3 gènes) ; le deuxième groupe (gènes *MAGE* de type II) comprend les gènes *MAGE D*, *E*, *F*, *G*, *H*, *L* et le gène *NECDIN* [Chomez *et al.*, 2001].

### 1.2.1 Les gènes *Mage* de type I [Chomez *et al.*, 2001]

Les gènes *MAGE* de type I sont situés sur le chromosome X. Les gènes *MAGEA* et *MAGEC* se trouvent en région Xq28 et q26-27 respectivement, tandis que les gènes *MAGEB* sont localisés en région Xp21. La plupart des protéines MAGE de type I ont une taille d'environ 300 acides aminés et sont encodées par un seul exon.

Les gènes *MAGE* de type I sont silencieux dans les tissus normaux à l'exception des cellules de la lignée germinale mâle et, pour certains, du placenta. Ils sont exprimés, par contre, dans les cellules tumorales de différents types histologiques [De Plaen *et al.*, 1994].

L'expression des gènes *MAGE* de type I dans les tumeurs résulte probablement d'une perte de méthylation de leur promoteur, conséquence d'une déméthylation globale de l'ADN [Smet *et al.*, 1996]. Certains de ces gènes codent pour des protéines dont la dégradation par le protéasome produit un peptide antigénique présenté à la surface cellulaire par des molécules MHC de classe I (HLA chez l'homme) et reconnu par des lymphocytes T cytotoxiques [Van der Bruggen *et al.*, 2002].

L'expression spécifique de ces peptides par les cellules cancéreuses en fait une cible de choix pour l'immunothérapie antitumorale. En effet, une réaction immunitaire dirigée contre ces



antigènes ne devrait pas engendrer d'altération des cellules germinales mâles car celles-ci n'expriment pas de molécules HLA [Huang *et al.*, 1999].

Les gènes *MAGE* de type I auraient un rôle dans la spermatogenèse. En effet, leur expression est spécifique et régulée dans les cellules germinales. Les gènes *MAGEA* sont exprimés dans les spermatogonies et spermatozoïdes tandis que les gènes *MAGEB* sont exprimés dans les spermatides [Chomez *et al.*, 1996 ; Clotman *et al.*, 2000].

### 1.2.2 Les gènes *MAGE* de type II [Chomez *et al.*, 2001]

Les gènes *MAGE* de type II sont exprimés dans de nombreux tissus somatiques, tant au cours du développement que chez l'adulte.

Les gènes *MAGE* de type II les mieux caractérisés sont *NECDIN* et *MAGED1*.

#### 1.2.2.1 *NECDIN*

*NECDIN* se situe dans la région q11.2-q12 du chromosome 15 humain et code une protéine de 321 acides aminés. Chez la souris, il est situé dans la région synténique du chromosome 7.

*NECDIN* serait un gène impliqué dans le syndrome de Prader-Willi (PWS), une maladie neurogénétique touchant un enfant sur 10 000 et dont les principaux symptômes sont un retard mental, un stress respiratoire à la naissance, une petite taille, un hypogonadisme et une hyperphagie menant à une obésité sévère. Des troubles du comportement sont également observés : difficultés à s'adapter à un nouvel environnement, prurits incessants et problèmes émotionnels tels que des accès de rage ou des obstinations. Chez les patients atteints du PWS, on peut aussi observer une diminution significative de neurones produisant l'ocytocine. On observe chez ces personnes une grande habileté visuo-spatiale et une excellente mémoire à long terme.

La maladie est causée par la délétion d'un fragment du chromosome 15 paternel s'étendant sur plus de 1500 kb et comprenant, entre autre, le gène *NECDIN* et le gène *MAGEL2*. Les allèles maternels des gènes de cette région chromosomique sont, quant à eux, inactivés par le phénomène d'empreinte génétique.

L'équipe de Tsai a été la première à obtenir des souris déficientes en *Necdin*. Ils n'ont remarqué aucun phénotype.

Gérard et ses collègues ont observé chez un autre mutant *Necdin*, une létalité, endéans les 30 heures suivant la naissance, associée à un stress respiratoire. Ils ont travaillé avec des souris issues de croisements entre des mâles hétérozygotes 129J croisés avec des femelles C57/Bl6/J ou avec des femelles FVB. Ils ont remarqué que les phénotypes des animaux déficients en *Necdin* sont influencés par le fond génétique. En effet, une mortalité postnatale a touché 95% des mâles mutés et 40% des femelles mutées issus du premier croisement alors que 80% des mâles mutés et 25% des femelles mutées issus du deuxième croisement sont morts durant cette même période.

L'équipe de Muscatelli travaillant sur un troisième modèle murin, des souris C57/Bl6/J déficientes pour le gène *Necdin*, a confirmé les résultats de Gérard et al., en plus, observé que les nouveau-nés déficients en *Necdin* souffrent d'hypotonie et de retard de croissance. Ces



souriceaux présentaient une diminution du nombre de neurones produisant l'ocytocine et la *LHRH* (luteinizing hormone-releasing hormone) au niveau de l'hypothalamus. De plus, les souris déficientes en *Necdin* ont un profil comportemental caractéristique qui rappelle les troubles comportementaux des patients touchés par le PWS: elles se grattent davantage, possèdent une plus grande aptitude pour l'apprentissage temporel et ont une meilleure capacité de mémorisation. Cependant, elles s'alimentent peu contrairement à l'hyperphagie observée chez les patients atteints par PWS. La constatation de phénotypes plus complexes chez les souris C57/Bl6/J de Muscatelli démontrent l'influence importante du fond génétique [Gérard *et al.*, 1999 ; Muscatelli *et al.*, 2000 ; Tsai *et al.*, 1999].

*NECDIN* est exprimé dans les neurones postmitotiques des systèmes nerveux central et périphérique. La protéine *NECDIN* peut se lier à p53, E2F1 et à la protéine antigénique T du virus SV40. *NECDIN* peut aussi interagir directement avec l'ADN et réprimer la transcription de gènes à partir de promoteurs contenant des séquences C-G. Il agirait ainsi en tant que corépresseur transcriptionnel [Taniura *et al.*, 1998 et 1999 ; Matsumoto, 2001].

La surexpression de *NECDIN* bloque le cycle cellulaire dans les cellules NIH3T3 et SAOS2 et inhibe l'apoptose induite par p53. Ces résultats suggèrent que *NECDIN* serait responsable du maintien de l'état post-mitotique des neurones et aurait un rôle dans la survie de certaines cellules du système nerveux central [Yoshikawa 2000, Barker et Salehi 2002, Taniura *et al.*, 1998].

### 1.2.2.2 Les gènes *MAGED*

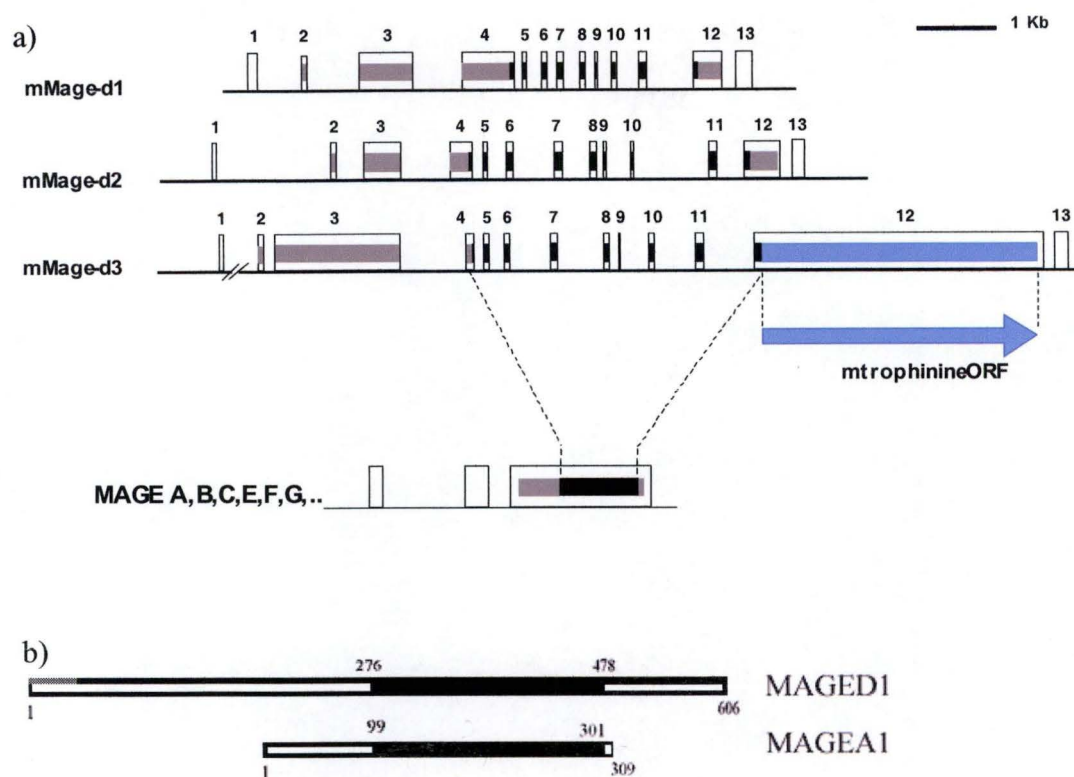
Il existe 4 gènes *MAGED* chez l'homme et 3 chez la souris. Chez l'homme, ces gènes sont situés dans la région Xp11.2. Cette région chromosomique est normalement touchée par l'inactivation d'un des deux chromosomes X dans les cellules femelles. Au début de l'embryogenèse, l'un des deux chromosomes X, de chaque cellule du blastocyste, est initialement choisi au hasard pour l'inactivation. Le fœtus femelle se développe donc comme une mosaïque dans laquelle les cellules expriment un chromosome X paternel ou maternel.

Les gènes *Maged* ont une structure génomique plus complexe que les autres gènes *Mage* : chez l'homme comme chez la souris, les gènes *Maged* contiennent 13 exons, leur phase ouverte de lecture s'étend de l'exon 2 à l'exon 12 et le MHD, de l'exon 5 à 11. Dans tous les autres gènes *Mage* la phase ouverte de lecture est codée uniquement par le dernier exon (Figure 3 a).

Les protéines *Maged* sont plus grandes que la plupart des autres protéines *Mage*, environ 600 acides aminés contre 300 (Figure 3 b) [Chomez *et al.*, 2001].

Plusieurs travaux relatifs à *MAGED1* ont été publiés, par contre, la fonction des protéines *MAGED2*, -D3, et *MAGED4* est complètement inconnue.





**Figure 3. Structure des gènes et des protéines *Maged*** a) Organisation génomique des gènes *Maged* murins par rapport aux autres gènes *Mage*. Les exons sont représentés par des rectangles. La phase ouverte de lecture est indiquée en gris et la séquence encodant le MHD en noir. b) Représentation schématique des protéines humaine *MAGED2* et *MAGEA1* (qui est représentatif des gènes *MAGEA*, -B et -C). ■ représente la régions d'homologie [Lucas *et al.*, 1999]

#### A. Le gène *MAGED1*

*MAGED1* se situe dans la région p11.23 du chromosome X chez l'homme. Ce gène code pour une protéine de 778 acides aminés également appelée *NRAGE* ou *DLXIN-1*.

Comme *NECDIN*, *Maged1* bloque la progression du cycle cellulaire lorsqu'il est surexprimé. C'est ce que l'on observe dans les cellules PC12 ou dans des cellules embryonnaires rénales 293 [Salehi *et al.*, 2000].

*Maged1* interagit avec le récepteur aux neurotrophines  $p75^{\text{NTR}}$ . Les neurotrophines appartiennent à une famille de protéines affectant la plupart des fonctions des neurones des vertébrés. Chez les mammifères, on connaît quatre neurotrophines : NGF (Nerve growth factor), BDNF (brain derived neurotrophic factor), NT-3 (neurotrophin-3) et NT-4 (Neurotrophin-4). Les neurotrophines peuvent se lier soit à des récepteurs Tyrosines kinases (Trk) soit au récepteur  $p75^{\text{NTR}}$ . La liaison des neurotrophines aux Trk promeut la survie cellulaire alors que la liaison à  $p75^{\text{NTR}}$  provoque la mort de la cellule. Cependant,  $p75^{\text{NTR}}$  peut favoriser la survie cellulaire notamment en activant NF $\kappa$ B, un facteur de transcription promouvant la survie de différents types cellulaires dont les neurones.

Lorsque NGF se lie à  $p75^{\text{NTR}}$ , celui-ci recrute *Maged1*. Le domaine MCD de *Maged1* se lie à la partie intracellulaire de  $p75^{\text{NTR}}$ . Cela déclenche une transduction de signal qui aboutit à l'apoptose par l'activation de JUN kinases et du facteur de transcription c-jun, par la

libération de cytochrome C, par le clivage de la caspase 9 et l'activation des caspases 3, et 7 (Figure 4) [Salehi *et al.*, 2000 et 2002].

Une deuxième voie apoptotique faisant intervenir Maged1 est connue. L'équipe de Jordan a, en effet, montré que Maged1 contrecarre l'effet anti-apoptotique de XIAP, une protéine appartenant à la famille des IAP (*inhibitor of apoptosis proteins*). Maged1 interagirait avec le domaine RING de XIAP, situé dans la partie carboxy-terminale de la protéine. C'est ainsi que Maged1 empêcherait les IAP d'inhiber l'action apoptotique de p53 (Figure 4) [Jordan *et al.*, 2001].

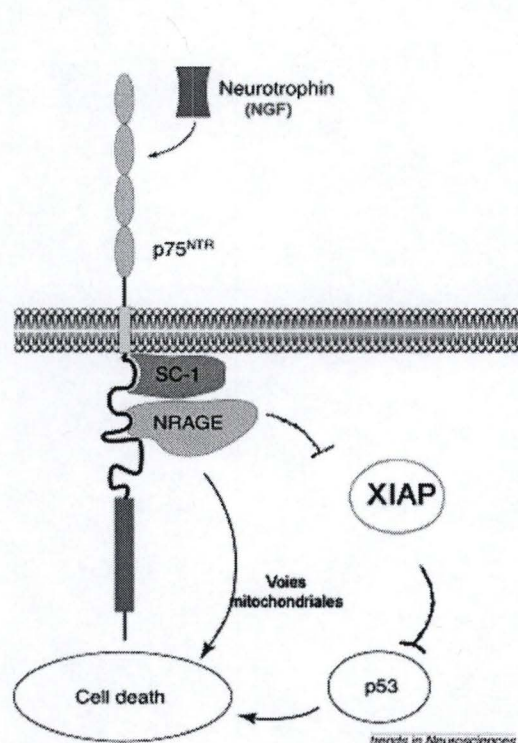


Figure 4. Schéma d'action de Maged1 (Nrage) Schéma inspiré de la figure1 de Frade 2000.

## B. Le gène MAGED2

*MAGED2* se situe sur le chromosome X, dans la région p11.23 chez l'homme et dans la région F3 chez la souris.

Son rôle reste encore inconnu. La protéine humaine *MAGED2* est constituée de 606 acides aminés. Le domaine Mage commence à l'acide aminé 279 et se termine à l'acide aminé 478. La protéine possède également un domaine riche en arginines (entre les acides aminés 215 et 258) et deux domaines de faible complexité (entre les acides aminés 476 et 502, et, 532 et 604). Les protéines *Maged2* humaines et murines sont très proches, leurs domaines Mage partageant 99% d'identité d'acides aminés (Figure 6).

## C. Le gène MAGED3

Ce gène se situe également sur le chromosome X, dans le région p11.22 chez l'homme et F3 chez la souris.

La protéine *MAGED3* est composée d'environ 2000 acides aminés. En effet, le domaine carboxy-terminal de *MAGED3* est beaucoup plus long que celui de ses paralogues (Figure 3a)



et est principalement constitué d'une séquence répétitive d'un petit peptide de neuf acides aminés. Cette séquence pourrait coder pour la trophinine, une protéine d'adhésion entre les cellules de l'endomètre et les cellules du trophoblaste. La trophinine aurait un rôle dans l'implantation et la placentation précoce [Saburi *et al.*, 2001].

#### D. Profil d'expression des gènes *Maged*

M. Bertrand a comparé les profils d'expression des trois gènes *Maged* murins pendant le développement (Figure 5). Des expériences d'hybridations in situ ont ainsi été réalisées sur des coupes d'embryons aux stades E12.5, E14.5 et E17.5.

Au stade E12.5, *Maged3* est exprimé principalement dans le système nerveux central mais aussi plus faiblement, dans la plupart des tissus (Figure 5 g). Le profil d'expression de *Maged2* est complémentaire à celui de *Maged3* : une faible expression de *Maged2* est détectée au niveau du cerveau, par contre, elle est plus forte dans le reste du corps (Figure 5 d). Les transcrits *Maged2* abondent dans plusieurs structures musculaires telles la langue, les muscles périvertébraux et les muscles de l'intestin et de l'estomac. Ils sont également présents dans des structures cartilagineuses comme le cartilage primordial des vertèbres et l'os baso-occipital. *Maged2* est également exprimé dans le cœur et l'aorte. La distribution du transcrit de *Maged1* couvre celle de *Maged2* et *-d3* avec une expression plus importante au niveau du système nerveux central que dans le reste du corps (Figure 5 a).

Au stade E14.5, l'expression de *Maged3* est importante dans les systèmes nerveux central et périphérique mais faible dans le reste du corps. *Maged3* n'est pas exprimé par les cellules du cœur, ni par celles du foie (Figure 5 h). Les transcrits de *Maged2* sont principalement détectés dans certains tissus dérivés du mésoderme tels les muscles (notamment les muscles intercostaux, périvertébraux, du diaphragme, et les muscles lisses du système digestif), certaines structures cartilagineuses, les poumons et l'intestin. Aucun transcrit de *Maged2* n'est observé dans le cœur ni dans le foie (Figure 5 e). Comme au stade E12.5, l'expression de *Maged1* résume celle de *Maged2* et de *Maged3*. Les transcrits de *Maged1* sont détectés dans toutes les parties du système nerveux central. Dans le cartilage costal, *Maged1* est exprimé plus fortement que *Maged2* (Figure 5 b).

Au stade E17.5, *Maged1* et *Maged3* présentent un profil d'expression similaire dans les structures des systèmes nerveux central et périphérique (Figure 5 c et i).

Aucun transcrit de *Maged2* et de *Maged3* n'est détecté dans le cœur et le foie. Seul un faible signal y est détecté pour *Maged1* (Figure 5 c, f et i). Par contre, dans le rein, l'expression des trois gènes *Maged* est observée (Figure 5 c, f et i). Dans les organes internes, les transcrits de *Maged1* et de *Maged2* sont observés dans les cellules dérivées du mésoderme mais pas dans les cellules épithéliales dérivées de l'endoderme. Les tissus dérivés de l'ectoderme n'expriment pas ou très peu *Maged2*.

Après la naissance, une augmentation de transcrits de *Maged1* est détectée par RT-PCR quantitative alors qu'on observe le contraire pour la protéine *Maged1*. Cela suggère l'existence d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle.

*Maged3* est fortement exprimé par les systèmes nerveux central et périphérique alors qu'on ne détecte pas l'expression de ce gène ailleurs, à l'exception du rein. La spécificité de l'expression de *Maged3* dans le système nerveux augmente lors des dernières étapes du développement. *Maged3* serait silencieux dans les cellules souches et commencerait à être



exprimé une fois que la cellule nerveuse quitte le cycle cellulaire et commence à se différencier. *Necdin*, membre de la famille des gènes *Mage*, est lui aussi exprimé spécifiquement dans les neurones post-mitotiques. *Maged3* pourrait, pour cette raison, avoir un rôle similaire à *Necdin*, à savoir le maintien de l'état différencié des neurones post-mitotiques.

Chez l'embryon humain, l'expression des gènes *MAGED1*, *-D2* et *-D3* a été analysée par Northern Blot sur de l'ARN issu de cerveau, de rein, de foie et de poumon.

*MAGED1* est fortement exprimé dans le cerveau fœtal, le rein et le foie. Toujours chez l'embryon humain, *MAGED2* est faiblement exprimé dans le foie, les poumons et le cerveau mais son expression est forte dans le rein. L'expression de *MAGED3*, similaire à celle de *MAGED1*, est forte dans le cerveau et le rein. Cependant aucun transcrite de *MAGED3* n'est détecté dans le foie et très peu dans les poumons. L'expression de *MAGED1* et de *MAGED3* dans le foie, chez l'homme, contraste avec les observations chez la souris. [Bertrand *et al.* 2003].

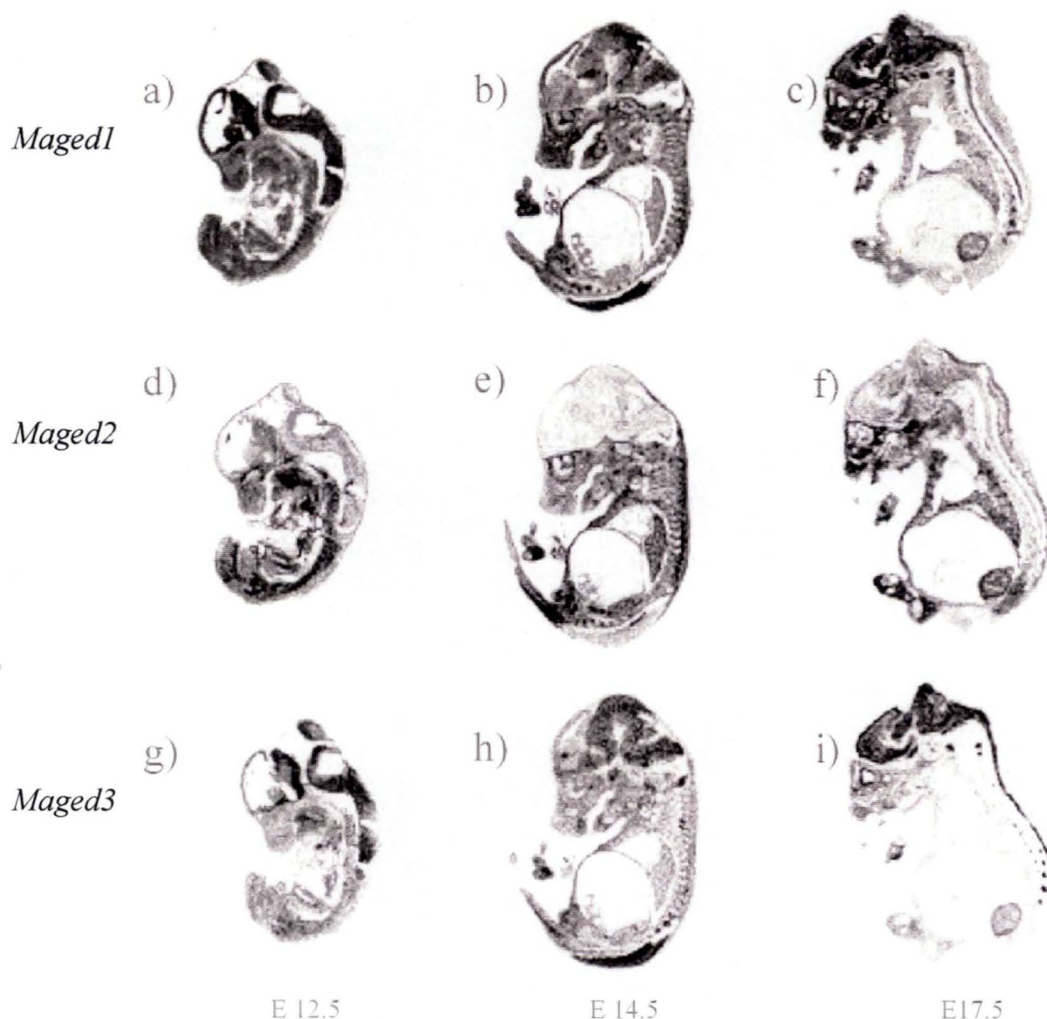


Figure 5. Hybridation in situ montrant l'expression de *Maged1*, *-d2*, *-d3* à différents stades du développement embryonnaire chez la souris. Des sondes ribonucléiques marquées au  $P^{33}$  ont été hybridées sur des coupes parasagittales d'embryons aux différents stades étudiés (E12.5, E14.5 et E17.5) et ont été révélées par autoradiographie [Bertrand *et al.*, 2004].

### 1.3. Evolution des gènes *Mage*

Les gènes *Mage* sont présents dans le génome des mammifères et chez d'autres espèces animales comme *Fugu rubripes* et *Danio rerio*. Le génome de *Fugu rubripes* ne contient qu'un seul gène *Mage* et celui de *Danio rerio* probablement aussi. L'organisation génomique du gène *Mage* de *Fugu Rubripes* est semblable à celle des gènes *Maged* : le gène *Mage* de *fugu Rubripes* possède également 13 exons qui sont, de plus, séparés par des introns insérés aux mêmes sites que dans les gènes *Maged* des mammifères [Bischof *et al.*, 2003]. Les gènes *Maged* sont les seuls gènes dont la phase ouverte de lecture est répartie sur plusieurs exons. Tout ceci suggère que les gènes *Maged* sont les gènes *Mage* originels. Les autres gènes *Mage* seraient issus de processus de rétropositions et duplications.

La rétroposition d'un gène *Maged* ancestral aurait généré les premiers membres des autres sous familles de gènes *Mage*. Ce mécanisme est fréquent dans le génome des mammifères.

Les duplications géniques ont contribué à l'expansion des sous-familles de gènes *Mage*. Certaines sont récentes. C'est le cas, par exemple, pour les gènes *Magea* murins : ils sont plus proches de leurs paralogues (jusque 99% d'identité d'acides aminés dans les régions codantes) que de leurs orthologues humains. D'autres duplications sont plus anciennes : par exemple celle qui a étendu la sous-famille des gènes *Maged*. Ces gènes ont évolué indépendamment pendant une longue période avant la séparation phylogénétique des deux espèces humaine et murine. En effet, les domaines carboxy- et amino terminaux sont tout à fait différents entre les paralogues *Maged* mais sont bien conservés entre les orthologues murins et humains.

Les protéines Maged1, -d2 et -d3 humaines et murines ont été bien conservées au cours de l'évolution. En effet, un haut taux d'homologie des MCD (Figure 6) suggère qu'elles exercent un rôle important mais différent dans ce phylum [Chomez *et al.*, 2001].

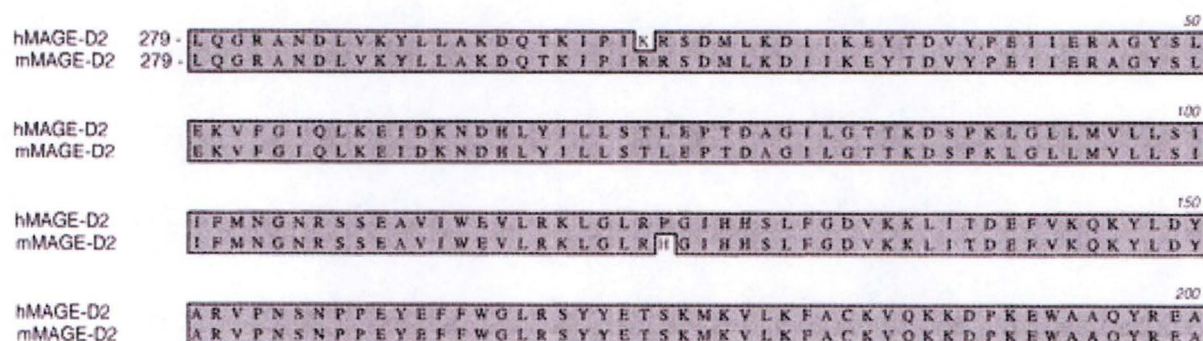


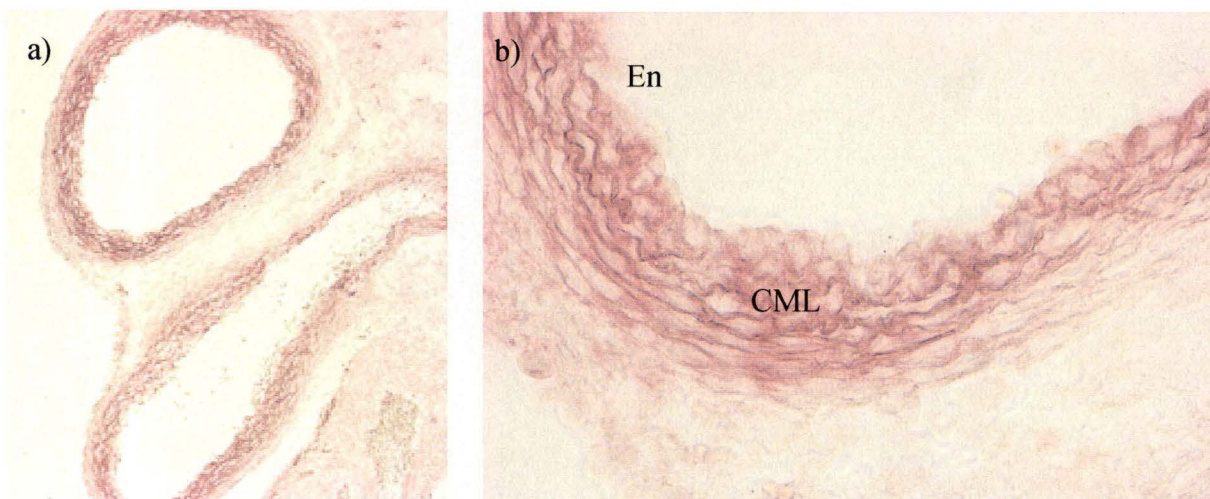
Figure 6. Alignement des MCD des protéines Maged2 humaine et murine. Maged1 et -d2 partagent 99% d'identité d'acides aminés avec leurs orthologues humains et Maged3 en partage 93% avec son orthologue humain [Chomez *et al.*, 2001].



## 2. Travaux réalisés antérieurement au laboratoire

Le laboratoire s'intéresse au rôle des protéines Maged chez la souris.

Pour commencer, le profil d'expression de *Maged2* a été étudié à différents stades du développement embryonnaire. Les profils d'expression des trois gènes *Maged* murins ont été examinés par ISH sur des coupes sagittales d'embryons (Figure 5). Le profil d'expression de *Maged2* a aussi été considéré à un niveau cellulaire. *Maged2* est principalement exprimé au niveau des cellules musculaires lisses des vaisseaux présentées sur la Figure ci-dessous. L'endothélium, quant à lui, ne semble pas être marqué (Figure 7).



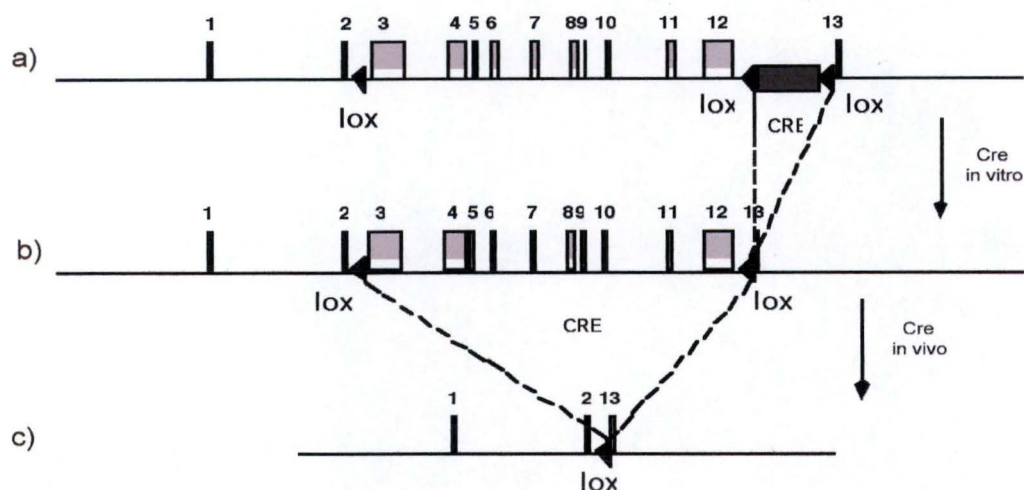
**Figure 7.** ISH marquage grâce au DIG sur coupes de d'embryons E18.5. a) Coupes transversales de veine et artère (100X) b) Coupe transversale d'artère. (400X) CML ; cellule musculaire lisse ; En, endothélium.

Ensuite, des partenaires protéiques de *Maged2* ont été recherchés par méthode du double hybride.

Enfin, afin d'étudier la fonction du gène *Maged2*, des souris « knock-out » pour ce gène ont été générées dans des animaux *Outbred* (dont le fond génétique est hétérogène) et ensuite dans des lignées *Inbred* (dont le fond génétique est homogène).

L'inactivation du gène *Maged2* a été réalisée grâce au système conditionnel Cre-Lox permettant la délétion des exons 3 à 12.

In vitro, un site lox a été introduit dans l'intron 2 du gène *Maged2* et un gène de résistance, PGK-néo, flanqué de deux sites lox, est introduit dans l'intron 12 (les sites lox ont tous la même orientation). Ce gène modifié constitue un vecteur de remplacement qui a été introduit dans des cellules ES murines où il a remplacé *Maged2* après recombinaison homologue (Figure 8a).



**Figure 8.** Technique de l'inactivation du gène *Maged2*. a) *Maged2* tel qu'il est transfecté dans les cellules ES. b) CRE exprimée de manière transitoire supprimera le gène de résistance. *Maged2* est flanqué de deux sites lox et est appelé « allèle conditionnel ». c) Des souris possédant l'allèle conditionnel sont croisées avec des souris exprimant CRE de manière ubiquiste et engendrent ainsi des mutants nuls de *Maged2* : la majorité de la partie codante du gène est déléetée.

En exprimant CRE de façon transitoire dans ces cellules, le gène de résistance PGK-néo est excisé (**Figure 8b**). Les cellules ES ont alors été agrégées avec des morula, puis transplantées dans des souris pseudogestante qui donneront naissance à des souris chimériques possédant l'allèle conditionnel (**Figure 8b**). Ces souris seront accouplées afin d'engendrer une descendance hétérozygote pour l'allèle conditionnel qui a, à son tour, été accouplée avec des souris transgéniques exprimant CRE de manière ubiquiste afin d'obtenir des mutants nuls *Maged2* (**Figure 8 c**).

Violette Dirix, dans le cadre de son mémoire *Contribution à la caractérisation fonctionnelle des gènes de la famille Mage*, a observé que des souris *outbred* déficientes pour le gène *Maged2* présentaient une mortalité périnatale d'environ 30% probablement due à des hémorragies dès le 13<sup>ième</sup> jour embryonnaire. Les hémorragies observées sont intra-abdominales et sous-cutanées au niveau de la face et des membres. Du lait peut être observé dans l'estomac des animaux nouveau-nés mutés pour le gène *Maged2*, ce qui montre qu'ils sont capables de respirer et de se nourrir.





Figure 9. a) E13.5 muté hémorragique. b) et c) P0 mutés hémorragiques.

En microscopie optique, V. Dirix a étudié la morphologie des animaux mutés mais aucune anomalie permettant d'expliquer les phénotypes observés n'a été décelée. La morphologie des gros vaisseaux semble normale (Figure 10). L'observation de cellules endothéliales, en microscopie électronique, n'a révélé aucune anomalie manifeste.

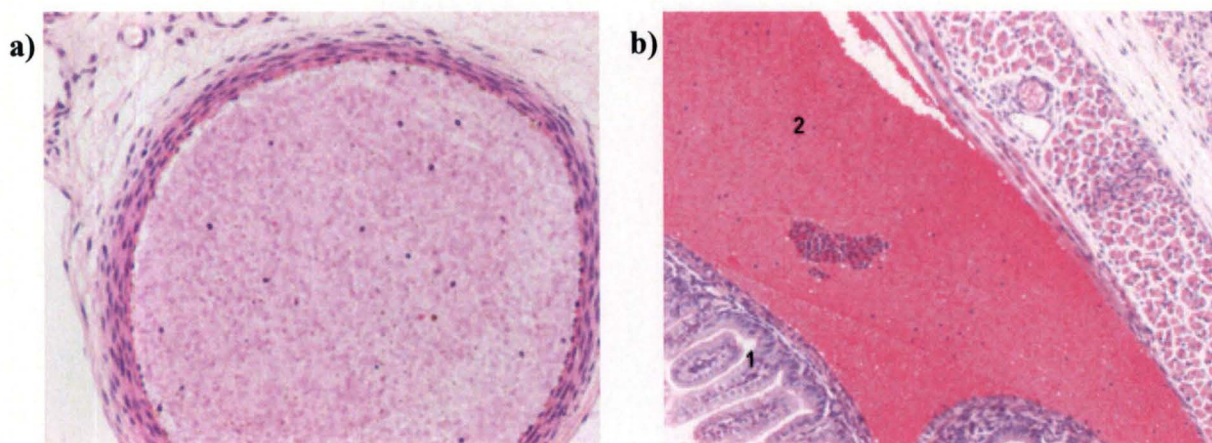


Figure 10. a) Coupe au niveau de l'aorte d'une souris P0 déficiente pour le gène *Maged2*. (coloration HES, 400x).

b) Hématopéritoine chez une souris mutée pour le gène *Maged2*. 1. Intestin ; 2. Cavité péritonéale gorgée de sang (coloration HES, 400x) Images tirées du mémoire de V. Dirix : Contribution à la caractérisation fonctionnelle des gènes de la famille *Mage*.

La pénétrance des phénotypes observés étant imparfaite, l'analyse phénotypique était problématique. Pour éviter une variabilité phénotypique due à l'hétérogénéité du génome, la mutation a été transférée sur un fond génétique stable. Pour cela, des souris C57/Bl6/J ont été choisies. Cette lignée de souris présente parfois un phénotype plus pénétrant comme c'est le cas, par exemple pour les souris déficientes en *Necdin*.



### 3. Hémorragies, pâleur ou mortalité périnatale causées par des mutations chez la souris

Comme cité plus haut, les souris mutées pour le gène *Maged2* présentent une mortalité périnatale importante, des hémorragies ou une pâleur prononcée. Des publications portant sur des souris présentant des phénotypes semblables pourraient nous orienter dans nos recherches.

#### L'intégrine $\beta_8$

Les souris déficientes en intégrine  $\beta_8$  présentent une mortalité à deux stades différents : 65% des embryons mutés meurent à la mi-gestation. Ils sont de petite taille et présentent une vasculogenèse normale. Les 35% restants meurent peu après la naissance et présentent des hémorragies intracérébrales et une cavité péricardique dilatée. Les cellules endothéliales sont hyperprolifératives, mal attachées à la matrice extracellulaire et leur membrane est fine et fenestrée. Des cellules sanguines sont présentes hors des capillaires. Ces derniers forment des structures tortueuses en agrégats. L'expression de la laminine y est discontinue [Zhu et al.2002].

#### Le PDGF et ses récepteurs

Le PDGF est un mitogène pour certains types cellulaires tels les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules gliales, etc. Il a différents effets cellulaires (chimotaxie, différenciation, production de matrice extracellulaire, contraction).

La famille du PDGF possède 3 ligands dimériques : AA, AB, BB. Les récepteurs au PDGF sont des tyrosine kinases composées de 2 chaînes : chaîne  $\alpha$  et la chaîne  $\beta$  (Figure 11). La fixation du ligand provoque la dimérisation du récepteur. Un changement de conformation active le domaine *tyrosine kinase*, permettant une transduction du signal.

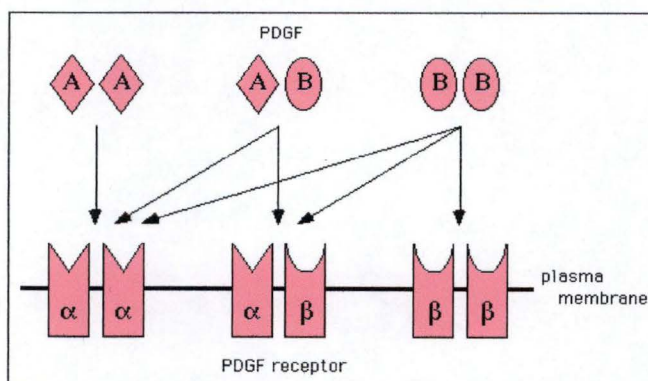


Figure 11. Les ligands PDGF et leurs récepteurs correspondants.

Macroscopiquement, les souris dont le gène *PDGFB* a été disrupté présentent une mortalité périnatale, des hémorragies et des oedèmes sous-cutanés. On peut observer des taches rouges au niveau des reins. Ceux-ci sont de petite taille à cause d'un développement glomérulaire anormal. L'espace de Bowman est rempli de sang, et il n'y a pas de cellules gliales. Le réseau capillaire est beaucoup plus simple que celui des animaux normaux. Ces anomalies structurelles diminuent l'aire de filtration glomérulaire et par conséquent compromettent la



fonction rénale (les animaux mutés ont une vessie contenant moins d'urine que les animaux normaux). On observe aussi une dilatation du cœur qui affecte les 2 ventricules. L'aorte est dilatée d'un facteur 2 : on compte un nombre normal de couches de cellules musculaires lisses mais l'épaisseur du muscle aortique est moins importante. Ces souris *knock-out* souffrent également d'anémie avec érythroblastose et thrombocytopénie. Les hémorragies et les oedèmes seraient causés par des microanévrismes lors des derniers jours de gestation, car c'est à ce moment que la pression sanguine augmente [Levéen *et al.*, 1994 ; Lindahl *et al.*, 1997].

Les souris dont le gène de la chaîne  $\beta$  du récepteur au PDGF a été inactivé présentent des œdèmes et des hémorragies sous-cutanées dues à la dilatation de veinules et à l'accumulation de globules rouges sous la peau. Ces souriceaux ne survivent pas plus de quelques minutes à une délivrance par césarienne. Ils meurent après être devenus très pâles et avoir perdu leur sang par le cordon ombilical.

Les souris mutées pour la chaîne  $\beta$  de ce récepteur présentent un phénotype à partir de E16.5. Aucun podocyte ni aucune cellule mésangiale ne sont observés dans les glomérules rénaux. Les espaces capsulaires sont remplis de cellules sanguines. On n'observe pas plus de réseaux capillaires complexes au niveau des reins. Les glomérules sont réduits ou manquants, ce qui diminue la surface de filtration rénale.

Ces souris présentent des défauts de maturation des cellules érythroïdes et thrombocytiques ainsi que des problèmes de la microvascularisation. Elles souffrent donc d'hémorragies, de thrombocytopénie et leurs globules rouges ont une forme et une taille irrégulière [Soriano, 1994].

#### Le facteur de coagulation VII et la prothrombine

Le facteur VII intervient dans la cascade de coagulation du sang (**Figure 12**). Les souris mutées pour ce gène se développent normalement mais présentent des hémorragies au moment de la naissance. Septante pour-cent des mutants souffrent d'hémorragies intra-abdominales fatales endéans les 24 heures ; les autres trente pour-cents meurent d'hémorragies intra-crâniennes. Des cellules sanguines sont présentes dans la cavité péritonéale [Elliott *et al.*, 1997].

La prothrombine est une sérine protéase. Elle est clivée et activée lors de la coagulation du sang et génère la thrombine.

La plupart des souris déficientes en prothrombine meurent d'hémorragies dès le jour E10.5, les autres sont très pâles et meurent quelques jours après la naissance (**Figure 13**). On peut observer des hémorragies intrapéritonéales et sous-cutanées dues à l'absence de prothrombine (du lait peut être observé dans l'estomac de ces animaux mutés, ce qui prouve qu'ils peuvent se nourrir) [Xue *et al.* 1998].

Ces observations sont intéressantes car elles se rapprochent de ce qui est observé au laboratoire. Un défaut dans la cascade de coagulation du sang doit être pris en compte dans la recherche des anomalies provoquant les phénotypes observés chez les souris mutées pour le gène *Maged2*.

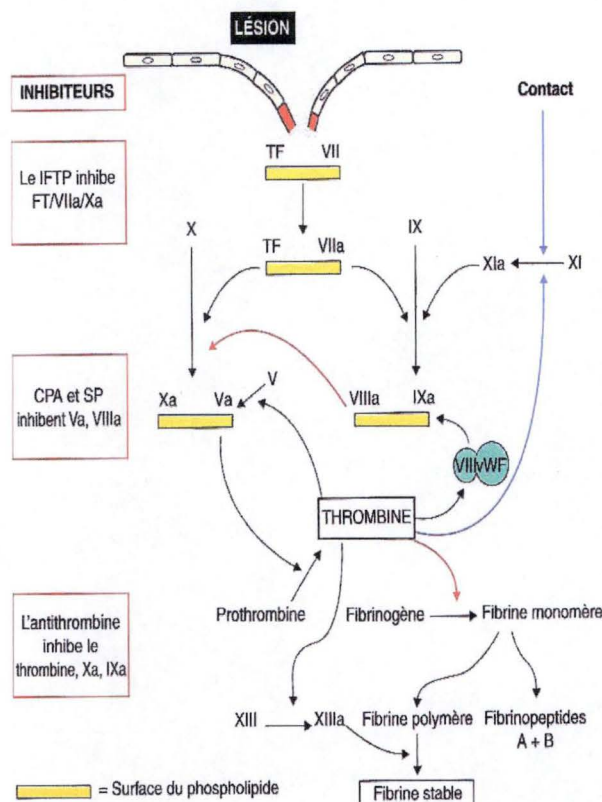


Figure 12. Voie de la coagulation. La lésion déclenche la libération d'un facteur tissulaire (FT). Celui-ci se lie et active le facteur VII. Ce complexe (TFVIIa) active les facteurs X et IX. Le complexe VIIa-IXa amplifie la production de Xa. La thrombine est formée à partir de la prothrombine par l'action de Xa-Va et ceci aboutit à la formation de fibrine. La thrombine active aussi FXI, active FVIII en la séparant de sa protéine porteuse (vWF), active le FV et le FXIII qui stabilise le caillot de fibrine [Tiré de Metha *et al.*, *Hématologie*, De Boeck, Bruxelles, 2003, p.132]

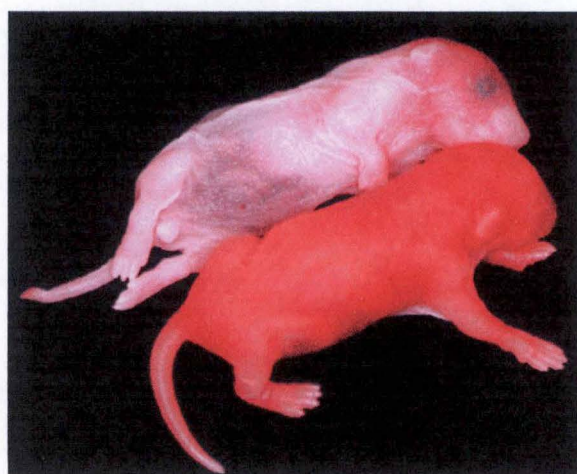


Figure 13. Souriceaux nouveau-nés. L'animal pâle est déficient en prothrombine [Xue *et al.* 1998].



VEGF

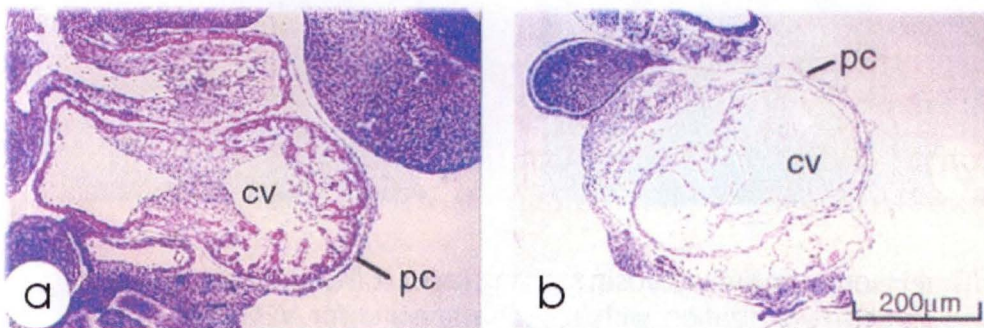
VEGF signifie *Vascular Endothelial Growth Factor*. Ce facteur est impliqué dans la formation du système vasculaire embryonnaire. La mutation du gène VEGF inhibe la plupart des étapes dans le développement précoce de la vasculogénèse (la différenciation des îlots sanguins, l'angiogénèse, la formation luminale des gros vaisseaux, etc).

Les souris déficientes pour *VEGF* souffrent de différents problèmes vasculaires :

- Une différenciation retardée des cellules endothéliales car VEGF agit comme un facteur de croissance pour ces cellules.
- Des défauts dans la fusion des angioblastes et dans la formation du réseau de cellules endothéliales car VEGF est un médiateur du contact cellule-cellule et cellule-matrice.
- Une régression accélérée des vaisseaux préexistants car VEGF est un facteur de survie pour les vaisseaux nouvellement formés.

Les souris mutées homozygotes meurent à mi-gestation. Chez ces souris, l'aorte dorsale est inexistante.

Les souris hétérozygotes pour la mutation *VEGF* présentent également des anomalies vasculaires : leur vasculogénèse est partiellement inhibée. Au huitième jour après fécondation (E 8.5), l'aorte dorsale est peu développée, la formation de l'atrium cardiaque et du ventricule primitif est retardée, la paroi du ventricule est très fine, les vaisseaux sanguins présentent des défauts de croissance (**Figure 14**). Chez ces mêmes animaux, au jour E9.5, les structures vasculaires sont anormalement élargies et remplies de cellules sanguines nucléées. On compte moins de cellules exprimant Flk1 et Flt1 (les récepteurs au VEGF) et elles sont désorganisées [Carmeliet *et al.*, 1996 ; Ferrara *et al.*, 1996].



**Figure 14.** Coloration à l'hématoxyline et éosine d'un embryons normal et d'un embryon porteur d'un allèle muté pour le gène VEGF au jour E10.5. Section de la région cardiaque : on observe une absence de différenciation des myoblastes chez l'animal hétérozygote (b) par rapport à l'animal normal (a). cv : ventricule commun ; pc : péricarde [Ferrara *et al.*, 1996]

LKB1

*LKB1* est un gène suppresseur de tumeurs. Il code pour une thréonine kinase. L'expression de *LKB1* est ubiquiste pendant le développement embryonnaire. Les animaux mutés meurent à la naissance ou à mi-gestation. Ils présentent des défauts du tube neural, des nécroses cellulaires au niveau du mésenchyme et des anomalies vasculaires. Le phénotype est associé à la dérégulation de l'expression de VEGF.

Ylikorkalo et son équipe ont observé que l'aorte dorsale des souris mutantes au jour E8.5 était plus fine que celle des animaux sauvages et même discontinue dans les parties antérieures. Ils ont aussi remarqué des anomalies au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules endothéliales [Ylikorkalo *et al.*, 2001].

Récepteur aux neurotrophine p75<sup>NTR</sup>

p75<sup>NTR</sup> est un récepteur aux neurotrophines.

Le gène p75<sup>NTR</sup> est transcrit en deux ARNm. La traduction de ces ARN génère deux variants protéiques de p75 : une forme courte (sp75<sup>NTR</sup>) et, une forme longue (FLp75<sup>NTR</sup>). L'absence de ces deux protéines conduit à un phénotype sévère. La mortalité périnatale des souris homozygotes mutées pour ce gène avoisine les 40%. La distribution mendélienne des génotypes est conservée jusqu'au jour embryonnaire E15.5, indiquant qu'il n'y a pas de mortalité embryonnaire jusqu'à ce stade.

Les souris qui survivent, présentent des anomalies au niveau vasculaire et neuronal. Une diminution du nombre de cellules de Schwann entraîne une ataxie des membres postérieurs. Les anomalies vasculaires sont caractérisées par une dilatation des grands vaisseaux sanguins dont les parois sont plus fines. On peut aussi observer une augmentation du diamètre de la lumière de la crosse aortique et des fuites des cellules sanguines. Les souris déficientes pour le gène p75<sup>NTR</sup> sont plus petites que leurs frères sauvages [von Schack 2001].



#### 4. But du mémoire

L'étude fonctionnelle d'une protéine peut, notamment, être abordée in vivo par l'inactivation génique chez l'animal. C'est ce qui est réalisé dans notre laboratoire. Les premières souris déficientes pour le gène *Maged2* étaient des souris *Outbred*. En effet, elles sont issues de plusieurs lignées de souris et donc génétiquement hétérogènes (**Figure 15**). Une mutation peut avoir une expression phénotypique très variable en fonction du fond génétique, tant chez l'homme que chez l'animal. C'est la raison pour laquelle nous avons transféré la mutation dans un fond génétique pur, C57/Bl6/J.

Ce travail sera consacré à l'étude phénotypique des souris déficientes pour *Maged2* de l'élevage *Inbred*.

Une mortalité périnatale a été mise en évidence dans l'élevage *outbred*. Nous commencerons notre étude par l'analyse de la viabilité des souris C57/Bl6/J déficientes pour *Maged2*.

Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons aux phénotypes apparents des souris déficientes pour *Maged2* dans le but de mettre en évidence des phénotypes éventuellement plus sévères que ceux observés dans le fond génétique mixte.

Enfin, l'étude phénotypique des souris déficientes en *Maged2* sera complétée par un examen microscopique de souriceaux à différents stades embryonnaires et à la naissance.

Nous orienterons nos recherches sur les cœurs et les reins, qui sont des organes cibles chez les souris présentant des anomalies vasculaires.

Ensuite, une grande partie de ce dernier point sera consacrée à l'étude de l'intégrité des vaisseaux. Pour cela, les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires seront examinées.

Le but de cette troisième partie est de découvrir une ou plusieurs anomalies vasculaires qui pourraient expliquer le phénotype hémorragique des souris déficientes en *Maged2*.

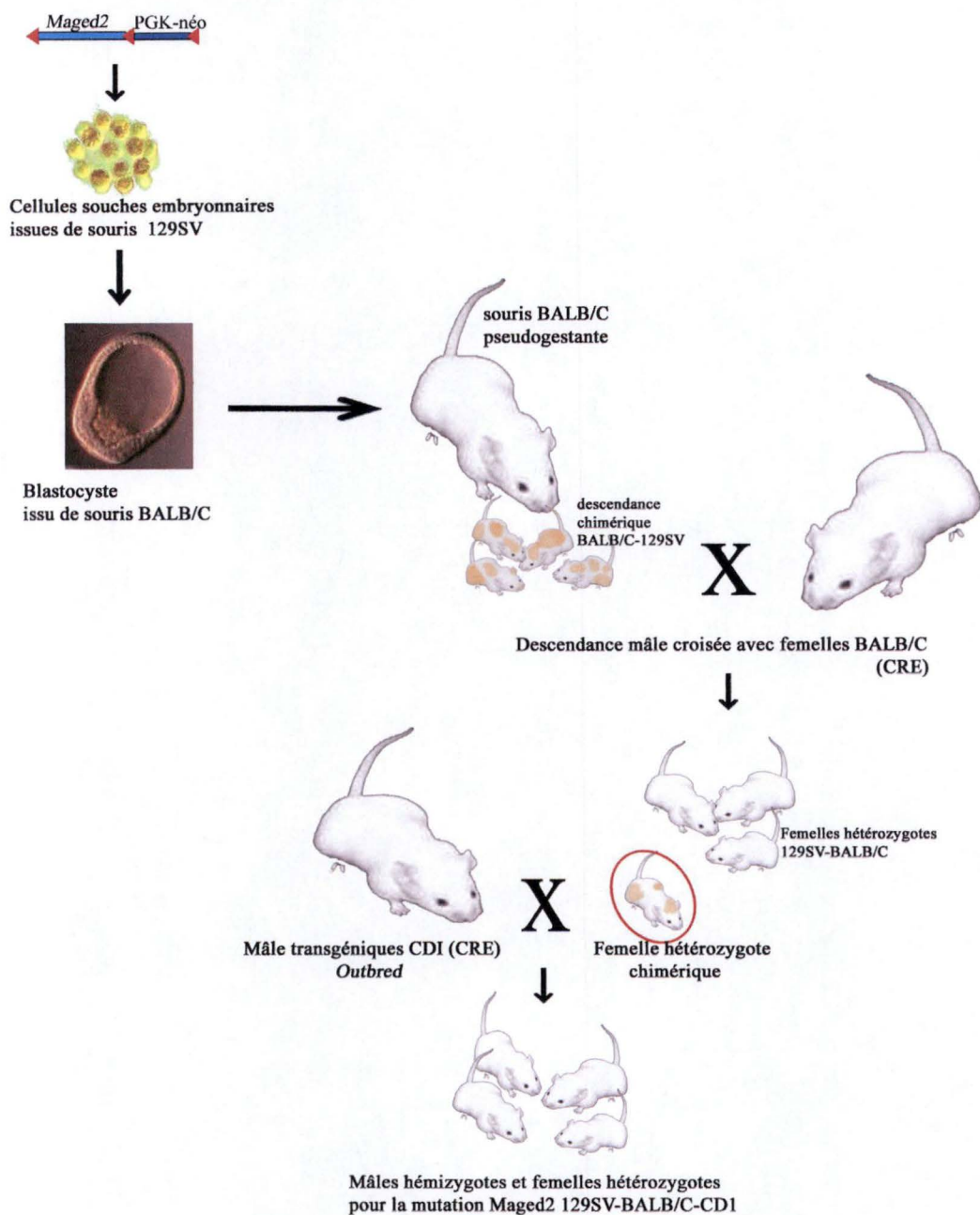


Figure 15. Les premières souris déficientes en *Maged2* possédaient un fond génétique hétérogène (129OLA, BALB/C et CDI).



## **Résultats, discussion et perspectives**



## 1. Transfert de la mutation *Maged2* dans la lignée C57/Bl6/J

Nous avons choisi de transférer la mutation dans la lignée C57/Bl6/J car, par rapport à d'autres, cette lignée permet une expression phénotypique plus pénétrante dans certains cas.

Le transfert de la mutation dans le fond génétique C57/Bl6/J a été réalisé en remplaçant, dans la lignée syngénique C57/Bl6/J, le gène *Maged2* normal (entouré d'un petit fragment chromosomique) par le gène *Maged2* muté. Pour cela, des bac-kcross successifs sont réalisés entre deux lignées : une lignée syngénique C57/Bl6/J qui fournit le fond génétique et une lignée donneuse qui fournit l'allèle délété de *Maged2*. Lors de chaque back-cross, on sélectionne les individus ayant acquis le locus d'intérêt provenant de la lignée donneuse. Les descendants sélectionnés sont ainsi croisés avec la lignée syngénique C57/Bl6/J. Au fur et à mesure des back-cross, suite au mécanisme de crossing-over, le seul matériel chromosomique provenant de la lignée donneuse et conservé dans la lignée syngénique se réduit à la zone du chromosome qui contient le locus différentiel. Ainsi, au bout de  $x$  générations, il reste seulement  $1/2^x$  du génome d'origine. Concrètement, le génome des souris de la 5<sup>ème</sup> génération est homogène à plus de 95%.

Le gène *Maged2* se trouve sur le chromosome X. Dès lors, les générations successives du back-cross seront issues de croisements entre des femelles hétérozygotes pour la mutation *Maged2* et des mâles de la lignée C57/Bl6/J (Tableau 1). En effet, la mutation doit être portée par les femelles pour permettre les crossing-over entre les chromosomes X qui sont responsables de l'homogénéisation du génome.

	X <sup>+</sup>	X <sup>-</sup>
X <sup>+</sup>	X <sup>+</sup> X <sup>+</sup> 25%	X <sup>+</sup> X <sup>-</sup> 25%
Y	X <sup>+</sup> Y 25%	X <sup>-</sup> Y 25%

Tableau 1. Croisement réalisé dans le back-cross et proportion des génotypes de la descendance d'après la distribution mendélienne.

Les descendance possibles de ce croisement sont des femelles et mâles sauvages, des femelles hétérozygotes et des mâles hémizygotes (Tableau 1). Dans les cellules femelles, un des deux chromosomes X est inactivé, éteignant, ainsi, un des deux gènes *Maged2*. Ce phénomène étant aléatoire, il est responsable d'une variabilité génique au sein des cellules femelles. Pour cette raison, nous avons choisi de ne travailler qu'avec des mâles hémizygotes. Toutes les souris examinées possédaient un génome homogène car elles constituaient les sixièmes et septièmes générations du backcross.



Nous avons d'abord entrepris une analyse macroscopique des souris hémizygotes pour *Maged2*. Nous avons étudié la viabilité de ces souris et recherché des anomalies macroscopiques. Ensuite, nous avons cherché des anomalies vasculaires, éventuellement responsables des phénotypes hémorragiques observés dans les souris *Outbred* déficientes en *Maged2*. Un phénotype hémorragique peut s'expliquer par un défaut de la cascade de coagulation ou par des problèmes d'intégrité au niveau du réseau vasculaire. Dans ce travail, nous nous sommes tournés vers l'aspect « problème d'intégrité au niveau du réseau vasculaire ».

## 2. Examen macroscopique des souris mâles hémizygotes pour la mutation *Maged2*

### 2.1. Analyse de la viabilité des souris mâles hémizygotes pour la mutation *Maged2*

Lors d'une étude comparable dans l'élevage *Outbred*, V. Dirix avait noté que 70% des mâles étaient sauvages et 30% seulement étaient hémizygotes.

Afin de déceler un éventuel déficit en mâles mutés dans l'élevage C57/Bl6/J, nous avons dénombré ces animaux le plus tôt possible après la naissance et trois semaines plus tard, au moment du sevrage. Ainsi, nous avons pu observer la proportion de mâles hémizygotes qui naissaient mais également leur survie après la naissance.

Tous les matins, nous allions inspecter les cages et compter les nouveau-nés. Ensuite, nous génotypions ces souris (**Génotypage des souris - 45 -**). Trois semaines plus tard, nous recommencions le génotypage.

Deux difficultés ont été rencontrées lors de cette étude:

- Les souris C57/Bl6/J présentent un cronisme (ingestion des jeunes) particulièrement développé.
- Le génotypage des souriceaux morts fonctionne très mal dans notre laboratoire.

Il est possible qu'un certain nombre de souriceaux morts aient échappé à notre analyse.

A la naissance, nous avons compté 50 souriceaux mâles. Seulement huit nouveau-nés se sont révélés hémizygotes, les 42 autres mâles étaient sauvages (**Tableau 2**).

D'après les lois de Mendel, nous aurions dû observer 50% de mâles hémizygotes et 50% de mâles sauvages, soit, un rapport 1:1. Or, les chiffres observés se rapprochent d'un rapport 5:1. La différence entre ces deux rapports est statistiquement significative (test du chi carré,  $\alpha = 0.01$  où  $\alpha$  est le risque d'erreur). Nous pouvons affirmer qu'une proportion importante des mâles hémizygotes meure avant la naissance.

Par la suite, nous avons déterminé la proportion de ces animaux qui atteignent l'âge du sevrage. Nous avons donc génotypé à nouveau les souris à trois semaines. Nous avons compté 39 mâles sauvages et un seul mâle hémizygote (**Tableau 2**). Sept mâles hémizygotes sur huit sont morts durant les trois semaines suivant la naissance alors que, seulement 3 mâles sauvages sur 39 sont morts pendant cette même période.

	Mâles sauvages	Mâles hémizygotes	Total
P0	42 (84%)	8 (16%)	50
Au sevrage	39	1	40

**Tableau 2.** Proportion des mâles sauvages et hémizygotes à la naissance (P0) et au sevrage.



## 2.2. Phénotypes observables à la naissance des souris mâles hémizygotes pour la mutation *Maged2*

Nous avons examiné les animaux de l'élevage *Inbred* en espérant observer des phénotypes plus fréquents ou plus sévères que ceux observés chez les souris de l'élevage *Outbred*. De plus, nous pourrions peut-être observer d'autres anomalies. Celles-ci, pourraient renseigner une voie d'investigation de la fonction de *Maged2*.

Le phénotype le plus souvent observé était une pâleur générale de l'animal nouveau-né (**Figure b**). Cette pâleur pourrait être causée par une anémie.

Dans l'élevage C57/B16/J, les souriceaux hémorragiques étaient morts à la naissance. Nous avons alors recherché la présence du phénotype juste avant qu'ils naissent (au stade E18.5). Nous avons pu observer, *in utero*, des mâles hémizygotes vivants, présentant des hémorragies (**Figure a**).

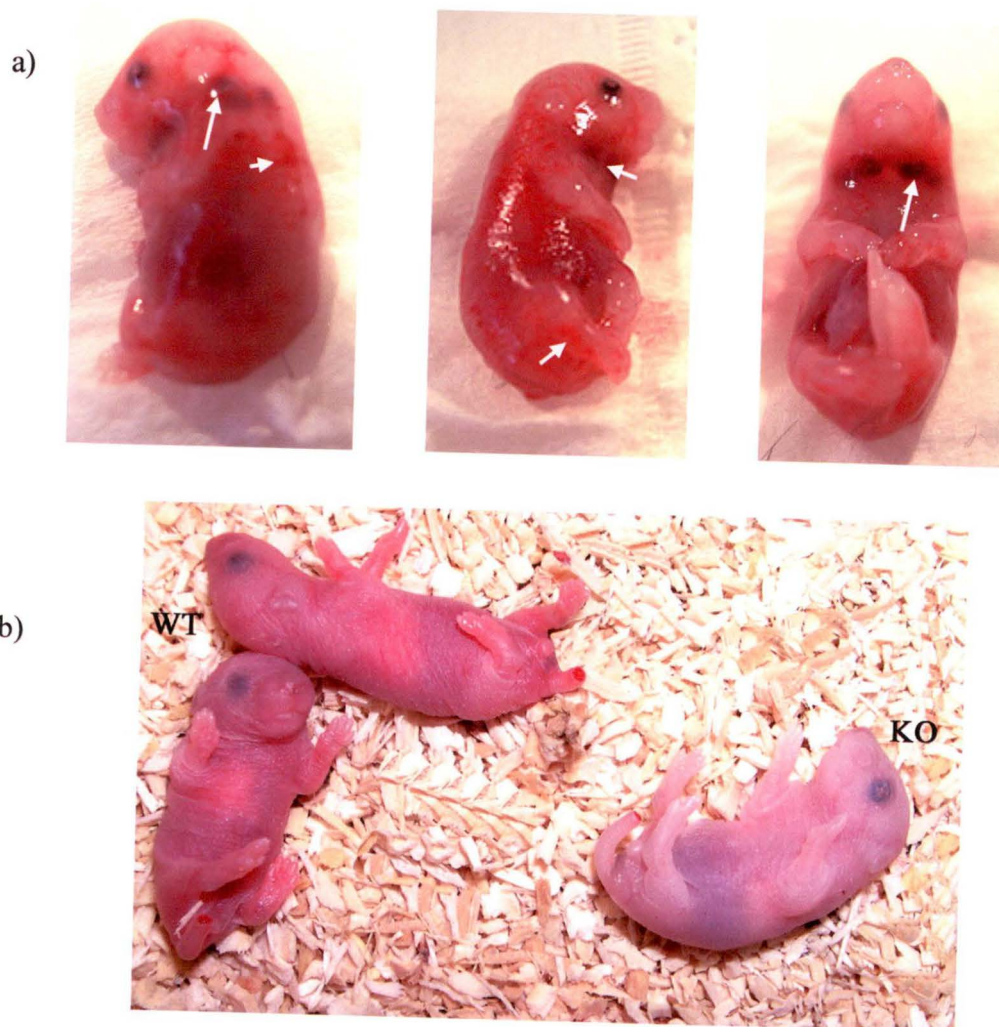


Figure 1. a) E18.5 mâle hémizygote hémorragique sous trois vues différentes. Les flèches indiquent les hémorragies. b) Souriceaux nouveau-nés. Le mâle déficient en *Maged2* (KO) est beaucoup plus pâle que ses deux frères sauvages (WT).



## 2.3. Discussion

Le déficit en mâles mutés à la naissance est plus important dans l'élevage de souris C57/Bl6/J que dans l'élevage de souris *Outbred*. Ce déficit est également plus important que lors de la première et deuxième génération du backcross. En effet, lors de ces premières générations, nous avons compté 13 (30%) de mâles hémizygotes et 31 (70%) mâles sauvages à la naissance, alors qu'aux sixième et septième génération du backcross, nous avons observé 42 (84%) mâles sauvages et 8 (16%) mâles hémizygotes.

Le déficit en animaux mutés observé à la naissance peut s'expliquer soit par le cannibalisme de leur mère parce qu'ils étaient morts, faibles ou anormaux, soit par une létalité à un stade embryonnaire.

Il serait intéressant de déterminer jusqu'à quel stade embryonnaire la distribution mendélienne des génotypes est conservée.

Une mortalité prénatale avait déjà été mise en évidence chez les souris de l'élevage *Outbred* mutées pour *Maged2* : elle a lieu à partir du 14<sup>ème</sup> jour embryonnaire (E14.5) pour des embryons issus du croisement entre des femelles mutées homozygotes et des mâles hémizygotes. Parmi les embryons morts, beaucoup présentaient des hémorragies intra-abdominales et sous-cutanées au niveau du cou, des yeux et des membres. (Étude par I. Bar et V. Dirix)

Une forte mortalité postnatale, entre la naissance et 21 jours plus tard, a également été observée dans l'élevage C57/Bl6/J. Seul un mâle déficient en *Maged2* sur huit atteint l'âge du sevrage.

Des hémorragies ont été observées chez les embryons C57/Bl6/J en fin de développement et chez des animaux mort-nés. L'existence de souriceaux hémorragiques vivants dans l'élevage *Outbred* mais pas dans l'élevage *Inbred* indique que ce phénotype est plus sévère chez ces souris *Inbred*. Le phénotype « pâle » est moins grave que le phénotype hémorragique car il est observable sur des nouveau-nés vivants de l'élevage *Inbred*. La pâleur caractéristique de certains souriceaux déficients en *Maged2* pourrait résulter d'une anémie.

L'anémie est une affection caractérisée par une diminution du nombre de globules rouges, du volume érythrocytaire et de la concentration en hémoglobine dans le sang circulant.

Dans des conditions normales, le volume érythrocytaire et la concentration en hémoglobine demeurent stables car des mécanismes régulateurs assurent l'équilibre de la production de globules rouges dans la moelle osseuse, d'une part et la dégradation de ces mêmes globules rouges par le système réticulo-endothélial, d'autre part. L'anémie résulte de la rupture de cet équilibre.

Les causes les plus fréquentes de l'anémie sont une production insuffisante de globules rouges ou une synthèse déficiente de l'hémoglobine dans la moelle osseuse ainsi que la spoliation sanguine (fuite du sang hors des vaisseaux) ou la destruction prématurées des érythrocytes. Enfin, l'anémie peut être d'étiologie mixte. On peut également classer les anémies suivant qu'elles soient d'origine chimique (anomalies au niveau des facteurs de coagulation) ou cellulaire (anomalie des plaquettes, globules rouges...).

Afin de confirmer l'anémie chez les souriceaux pâles, des frottis sanguins seront analysés. Ainsi, nous pourrions comparer les formules sanguines des animaux sauvages et déficients en *Maged2* [d'après Longpré bernard, *Les anémies*, Ed. Masson, Paris, 1994].



### 3. Recherche d'anomalies vasculaires

#### 3.1. Etude histologique

Lors de cette première approche histologique, nous avons choisi la coloration HES (*hémalum-érythrosine-safran*) permettant de repérer d'éventuelles anomalies structurales au niveau du système vasculaire. Nous avons focalisé notre attention sur le cœur et le rein qui sont le siège d'anomalies chez certains mutants présentant des problèmes vasculaires. Nous avons réalisé un Western Blot pour confirmer l'expression de *Maged2* dans ces organes (**figure2**).



**Figure 2.** Western Blot réalisé sur un lysat protéique d'embryon à E18.5. EWT : lysat d'embryon entier sauvage ; EKO, lysat d'embryon entiers mutés pour *Maged2* a) Révélation anti-*Maged2*; b) Révélation anti- $\beta$  actine.

La protéine est présente dans le cerveau, le cœur et le rein mais indétectable dans le foie.

Pour cette étude histologique, des animaux ont été sacrifiés et génotypés à différents stades embryonnaires E14.5 et E18.5, et à la naissance. Les mâles hémizygotes ont été comparés à des animaux sauvages de la même fratrie. Les photos illustrant ce travail ont été sélectionnées de manière à être les plus représentatives de l'observation générale des coupes.

##### 3.1.1. Analyse histologique du rein

L'unité fonctionnelle du rein est le néphron. Il est composé du glomérule et d'un système tubulaire. Le système tubulaire comprend les tubes contournés proximaux et distaux. Ils sont composés de cellules épithéliales cylindriques et cubiques respectivement. Les microvillosités des tubes contournés proximaux sont nombreuses et hautes tandis que celles des tubes contournés distaux sont courtes et éparées, ce qui ne les rend pas observables en microscopie optique après coloration à l'HES. Les tubes collecteurs de Bellini sont composés de cellules cubiques, leurs faces latérales sont bien visibles et leur pôle apical est bombé. [D'après Gartner *et al.*, *Atlas en couleur d'histologie en couleurs*, Ed. Pradel, Paris, 1997, pp. 300-309]



### **3.1.1.1. Le rein embryonnaire [Figure 3]**

La figure 3 montre les reins d'embryons sauvages et déficients en *Maged2*.

Tant chez l'animal muté que chez le sauvage, nous pouvons observer le glomérule normalement situé dans la chambre glomérulaire (figure 3a et b). Le système tubulaire paraît normal chez l'embryon déficient en *Maged2* : nous pouvons distinguer des tubes contournés proximaux et distaux ainsi que des tubes collecteurs de Bellini (Figure 3 a-d).

Les cellules glomérulaires et tubulaires sont attenantes et ont un aspect normal.

### **3.1.1.2. Le rein de nouveau-nés [Figure 4]**

Plusieurs animaux mutés ne présentant pas le phénotype « pâle » ont été observés. Chez ces animaux, aucune anomalie n'a été mise en évidence. Toutefois, au cours de cette étude, nous avons pu examiner un souriceau nouveau-né « pâle ». La figure 4 représente le rein de cet animal et de son frère sauvage. Les structures observables (glomérule, chambre glomérulaire, tubules contournés,...) chez l'animal sauvage sont présentes également chez l'animal muté. Nous pouvons distinguer les microvillosités des tubules contournés proximaux. Des capillaires sanguins sont présents. Remarquons, toutefois, que le tissu rénal de cet animal muté est plus lâche que celui de son frère sauvage. Le glomérule a l'air plus rétracté dans la chambre glomérulaire, certaines cellules ont l'air de se détacher de leur lame basale (flèche) et des oedèmes (tête de flèche) sont observables.

## **3.1.2. Analyse histologique du cœur**

### **3.1.2.1. Le cœur embryonnaire [Figure 5]**

Aucune anomalie n'a été décelée par l'étude morphologique de cœurs d'animaux déficients en *Maged2* (figure 5). Les cardiomyocytes de l'embryon muté ont un aspect semblable à ceux de l'embryon sauvage. A ce stade, nous pouvons observer des globules rouges nucléés et des mitoses. L'endocarde de l'animal muté présente un aspect pavimenteux normal comparable à celui de l'animal sauvage.

### **3.1.2.2. Le cœur de nouveau-nés [Figure 6]**

Plusieurs cœurs de souriceaux nouveau-nés ont été observés. Chez les souriceaux ne présentant pas le phénotype « pâle », aucune anomalie morphologique n'a pu être décelée. Cependant, chez l'animal « pâle », dont le rein a déjà été décrit plus haut, nous avons remarqué que le tissu cardiaque avait un aspect plus lâche. Comme ceux de son frère sauvage, les cardiomyocytes de ce souriceau sont arrangés de manière uniforme, bien que moins compacte (Figure 6a et b). Au niveau de l'apex du cœur, un grand foyer de fibres cardiaques nécrosées ou autolysées peut être observé chez l'animal muté (Figure 6d). Les fibres altérées sont caractérisées par une éosinophilie plus importante et des cellules dont le noyau est pycnotique. Remarquons qu'une petite zone de fibres nécrosées ou pycnotique est aussi présente chez l'animal sauvage (Figure 6c).



### 3.1.3. Discussion

Aucune anomalie au niveau des reins et des cœurs n'a été observée par coloration HES.

Dans un seul cas, nous avons noté une différence : l'aspect plus lâche des tissus de l'animal muté qui présentait un phénotype « pâle ». Cette différence tissulaire pourrait être due soit à une autolyse, si le prélèvement des organes de l'animal muté n'a pas été effectué assez rapidement, soit à une nécrose tissulaire. La présence d'un petit foyer de fibres cardiaques nécrosées trouvé chez la souris sauvage soutiendrait l'hypothèse de l'autolyse alors que le phénotype « pâle » de l'animal muté pour *Maged2* appuierait l'hypothèse de la nécrose. En effet, si l'animal est anémique, l'état d'anoxie augmente au sein des différents organes. Il en résulte, dans ce cas, une nécrose des tissus.

Nous n'avons pas été à même de trancher entre ces deux hypothèses car nous n'avons plus obtenu, dans notre élevage, d'animal pâle par la suite.

Etant donné que de nombreuses anomalies vasculaires sont associées à des malformations cardiaques, l'examen morphologique de cœurs de souris déficientes en *Maged2* est important. Pour cette prochaine étude, des coupes sériées de cœurs de souris déficientes en *Maged2* seront analysées.







+

-

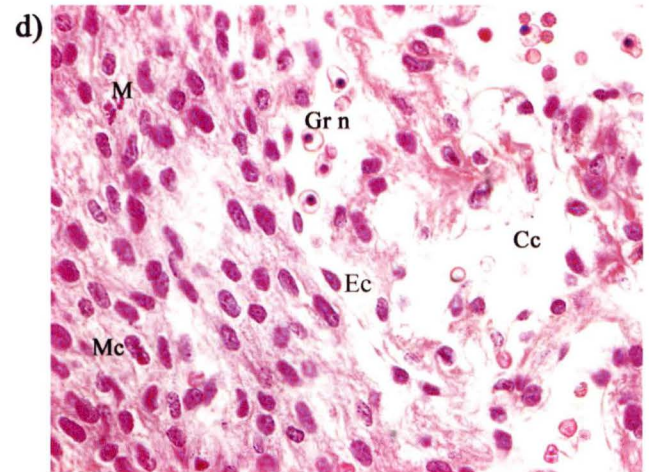
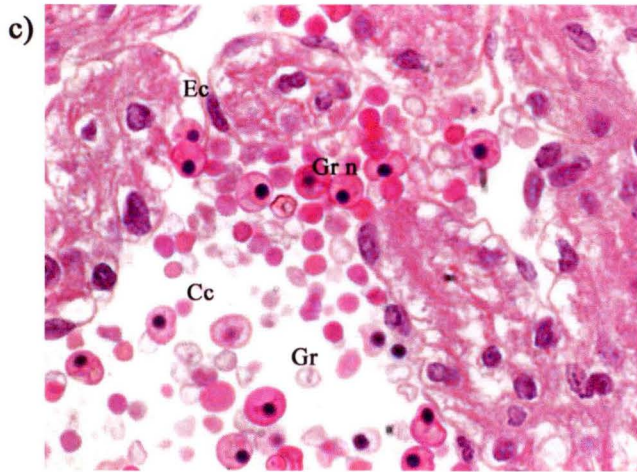
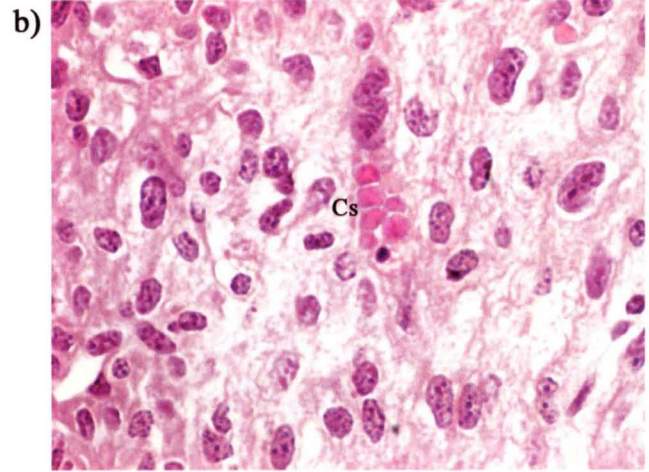
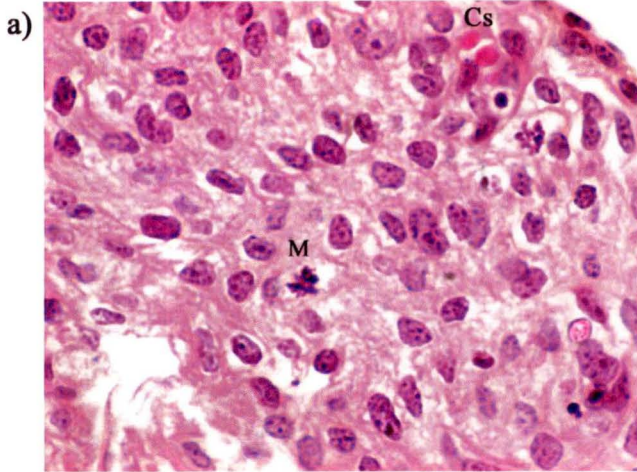


Figure 5. Coupes en paraffine de coeurs d'embryons E14.5 sauvages (+) et KOd2 (-)

a) E14.5 sauvage. Myocarde (600x) b) E14.5 KOd2. Myocarde (600x)

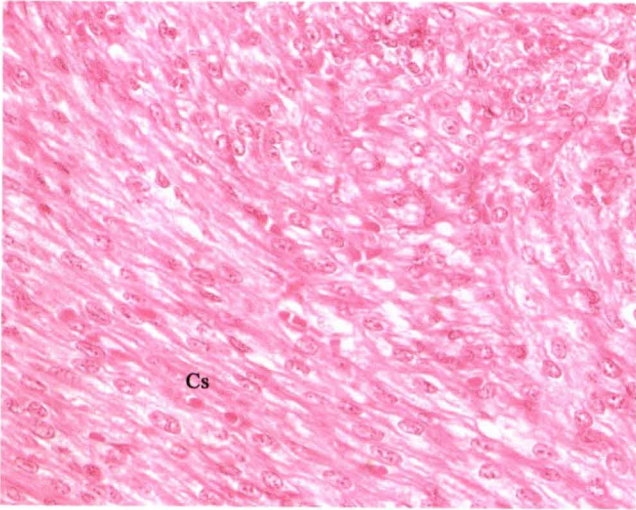
c) E14.5 sauvage. cavité cardiaque (600x) d) E14.5 KOd2 cavité cardiaque et myocarde (400x)

*Cc, cavité cardiaque ; Cs, capillaire sanguin ; Ec, endocarde ; Gr, globule rouge ; Gr n, Globule rouge nucléé  
M, mitose ; Mc, myocarde*



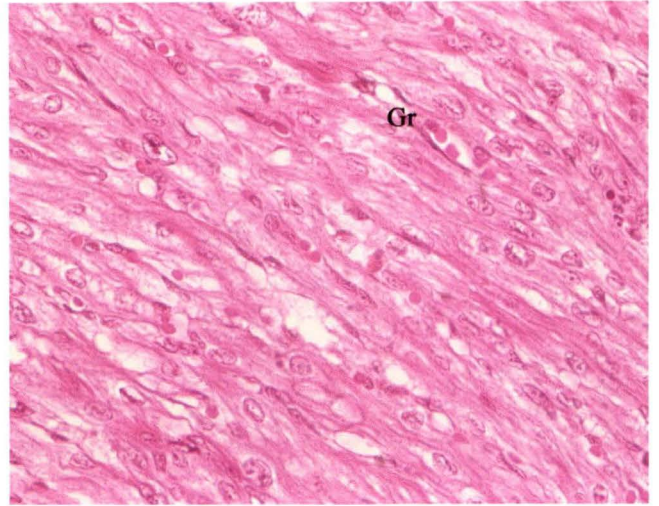
+

a)

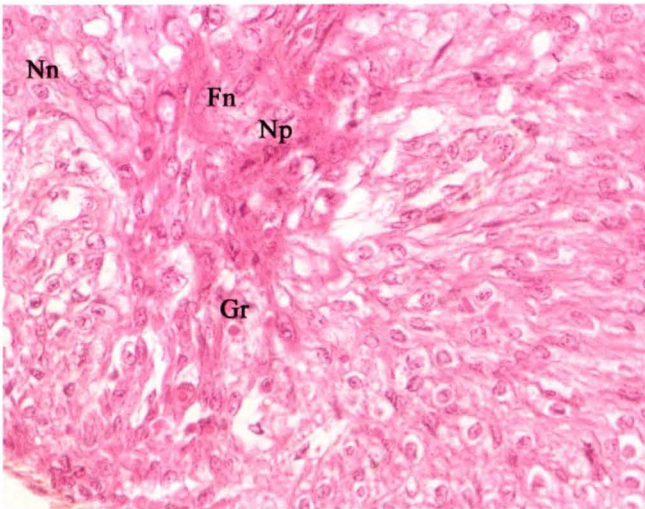


-

b)



c)



d)

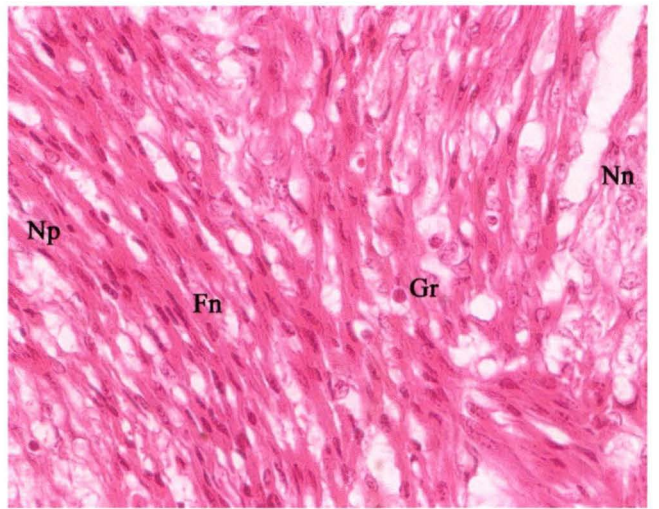


Figure 6. Coupes en paraffine de myocarde de souriceaux P0 sauvage et KOD2 présentant le phénotype "pâle" (400X)

a) P0 sauvage. Myocarde. b) P0 KOD2 "pâle". Myocarde.

c) P0 sauvage. Myocarde, zone nécrosée. d) P0 KOD2 "pâle". Myocarde, zone nécrosée.

*Cs*, capillaire sanguin ; *Fn*, fibres nécrosées ; *Gr*, globule rouge ; *Nn* noyau normal ; *Np*, noyau picnotique.



### 3.2. Etude immunohistochimique

Le marquage immunohistochimique des cellules endothéliales et musculaires lisses permet d'examiner la structure des vaisseaux sanguins.

L'antigène que nous avons détecté pour identifier les cellules endothéliales est le CD31 (aussi appelé PECAM-1). Il s'agit d'une glycoprotéine de surface intervenant dans les interactions cellules-cellules. Le CD31 est exprimé par les cellules endothéliales embryonnaires et adultes. Les cellules musculaires lisses seront mises en évidence grâce à l' $\alpha$ -actine. L'actine et la myosine sont les deux éléments majeurs du cytosquelette impliqués dans la mobilité cellulaire. Il existe six isoformes de l'actine dont quatre sont spécifiques aux cellules musculaires lisses. L'anticorps utilisé est dirigé contre un peptide situé dans la partie aminoterminal spécifique de l'actine des cellules musculaires lisses.

Le cœur, les vaisseaux artériels et veineux constituent le système circulatoire. Ils possèdent en commun un endothélium bordant leur lumière et reposant sur une lame basale. Endothélium et lame basale constituent à eux seuls la paroi des capillaires. Les artères et les veines s'habillent de tuniques variées.

Les artères présentent un calibre régulier. Leur paroi est adaptée à une pression importante. Elle s'organise en trois tuniques qui sont de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la media, l'adventice (Figure 13).

- l'intima est constituée d'un endothélium et est soutenue par une lame basale et une limitante élastique interne
- la media est un manchon compact de cellules musculaires lisses disposées concentriquement
- l'adventice, tunique plus mince, contient des fibres collagènes et élastiques parallèles à l'axe du vaisseau

Les artères sont classées en trois groupes en fonction de leur calibre et de la structure de leur paroi : les artères élastiques, les artères musculaires et les artérioles.

Les artères élastiques comprennent toutes les artères de gros calibre à savoir l'aorte et le départ de ses ramifications. Leur media, riche en lames élastiques concentriques, est conçue pour résister aux variations importantes de pression qu'elle subit.

Les artères musculaires regroupent les artères de moyen calibre et de petit calibre. Les artères musculaires assument les rôles de régulation de la distribution sanguine et de maintien de la pression artérielle.

Les artérioles, se distinguent des petites artères par leur paroi simplifiée. La media, toujours présente, peut contenir jusqu'à trois couches de cellules musculaires lisses maximum. L'adventice, très mince, est parfois absente.

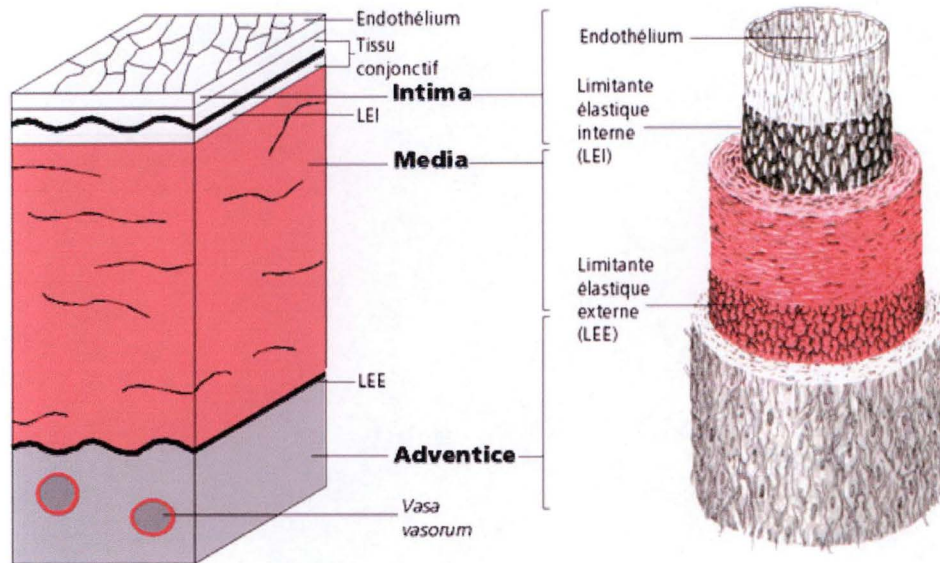


Figure 13. Tuniques caractéristiques des artères.

Les veines assurent le retour du sang au cœur. La circulation sanguine s'y effectue à basse pression. La paroi des veines montre une architecture comparable à celle des artères mais en diffère en plusieurs points : la paroi des veines est plus mince et leur lumière est plus grande. La media, tout en formant un manchon concentrique, est moins dense en cellules musculaires adoptant une configuration irrégulière. Enfin, l'adventice est la tunique la plus développée. Les veines sont également classées en fonction de leur topographie, de leur paroi et de leur fonction. Ainsi on distingue les veines musculaires, les veines réceptrices supra-cardiaques et les veinules.

Les veines musculaires doivent assurer un retour du sang vers le cœur. Elles sont équipées de valvules. La media n'assume peu ou pas de fonction contractile mais joue plutôt un rôle de contention pariétale. Les veines supra-cardiaques jouent un rôle passif dans la circulation de retour. Leur paroi est souvent très mince. Les veinules regroupent toutes les veines de petit calibre qui collectent les réseaux capillaires. Par convention, leur média peut en contenir jusqu'à trois assises concentriques maximum. L'adventice reste toujours présente, même autour des veinules les plus petites [d'après l'atlas digital de morphologie microscopique du Département Histologie-Embryologie des FUNDP].

Pour cette étude cinq portées ont été sacrifiées. Chaque animal muté est comparé avec un animal sauvage de la même fratrie.



### 3.2.1. Analyse des cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales sont des composants importants de la paroi des vaisseaux sanguins. Elles se trouvent à l'interface entre les compartiments sanguins et tissulaires. Leur fonction principale est la régulation du tonus vasomoteur, de l'hémostase et du trafic des leucocytes.

L'intégrité des vaisseaux sanguins passe, entre autre, par l'analyse des cellules endothéliales. Cela nous a été possible grâce à des techniques immunohistochimiques.

Nous avons recherché d'éventuels défauts dans l'organisation de ces cellules qui pourraient expliquer les hémorragies observées dans l'élevage de souris *Outbred* et le phénotype « pâle » aussi observé dans l'élevage *Inbred*.

Nous avons examiné les cellules endothéliales d'embryons, aux stades E14.5 et E16.5, et de nouveau-nés. Les photos illustrant ce travail ont été sélectionnées de manière à être les plus représentatives de l'observation générale des coupes. Pour les embryons, nous avons réalisé des coupes sagittales de l'embryon entier alors que pour les nouveau-nés, nous avons examiné des coupes transversales de pattes.

#### 3.2.1.1. Etude des cellules endothéliales embryonnaires [Figure 7 et 8]

Nous avons classé les vaisseaux selon deux critères suivant qu'ils appartiennent au système veineux ou artériel et suivant leur calibre. Aucune différence n'est observée au niveau des cellules endothéliales entre l'embryon muté et l'embryon sauvage.

Les cellules endothéliales observées ici sont attenantes et présentent leur forme pavimenteuse caractéristique. Elles sont présentes dans les différents types de vaisseaux (capillaires, vaisseaux de petit calibre (figure 8) et vaisseaux de moyen calibre (figure 7a-c), aussi bien dans le système veineux, qu'artériel.

Dans les reins, les cellules endothéliales se situent principalement au niveau des glomérules et en périphérie des tubules aussi bien chez l'embryon sauvage que chez l'embryon muté. De nombreux capillaires sanguins sont aussi observables (figure 7 e et f).

#### 3.2.1.2. Etude des cellules endothéliales de nouveau-nés [Figure 9]

La figure 9 représente des coupes transversales de pattes de souriceaux nouveau-nés. Les pattes sont siège d'hémorragies chez les souris déficientes en *Maged2*. Nous y avons donc recherché des anomalies vasculaires.

Le tissu observé est riche en petits vaisseaux (capillaires, veinules et artérioles) tant chez le souriceau normal que chez le muté. Aucune différence de structure ou du nombre de vaisseaux n'a pu être mise en évidence.

### 3.2.1.3. Discussion

Grâce à la technique d'immunohistologie, nous avons pu marquer les cellules endothéliales à l'aide d'anti-corps anti-CD31.

Chaque type de vaisseaux sanguins (de moyen calibre, de petits calibres et capillaires) est retrouvé chez les individus déficients en *Maged2*. De plus, les vaisseaux sont marqués avec la même intensité chez les animaux sauvages et déficients en *Maged2* aux différents stades que nous avons étudiés.

Des analyses quantitatives pourraient être suivies pour comparer la densité de vaisseaux sanguins chez les souris sauvages et mutées. On pourrait également analyser un animal muté, présentant le phénotype pâle ou hémorragique, par sériation de coupes transversales, ce qui permettrait d'observer des vaisseaux importants tels que l'aorte.

L'examen des cellules endothéliales cardiaques serait intéressant et permettrait de compléter l'étude morphologique du cœur en HES.



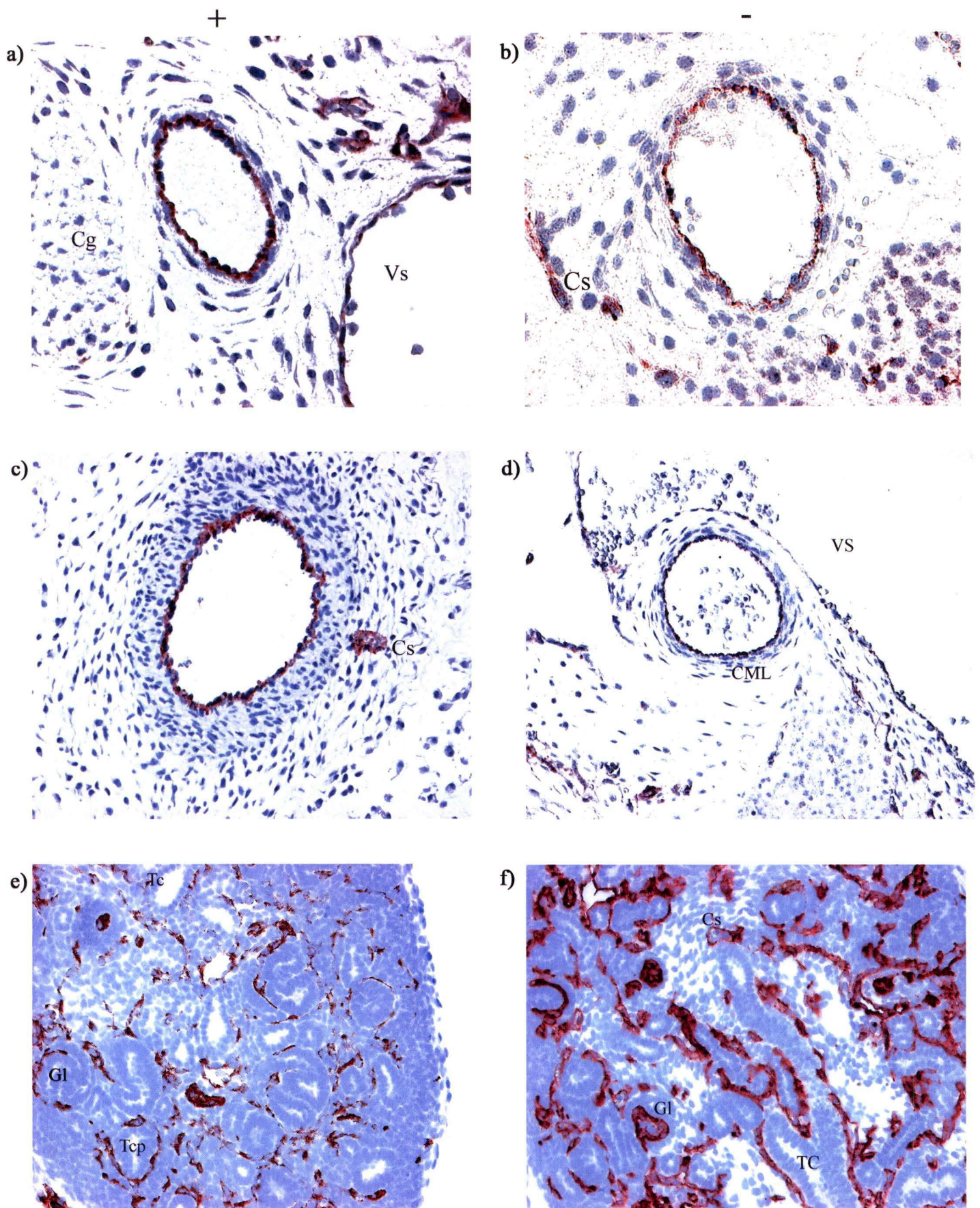


Figure 7. Marquage de cellules endothéliales d'embryons sauvages (+) et KOd2 (-)

- a) E16.5 sauvage. Coupe transversale de veine (400X) b) E14.5 KOd2. Coupe transversale de veine (400X)  
 c) E16.5 sauvage. Coupe transversale d'artère (200X) d) E16.5 KOd2. Coupe transversale d'artère (200X)  
 e) E14.5 sauvage. Rein (200X) f) E14.5 KOd2. Rein (200X)

CML, cellule musculaire lisse ; Cg, cartilage ; Cs, capillaire sanguin ; Gl, glomérule ;  
 TC, tube collecteur de Bellini ; Vs, vaisseaux sanguins



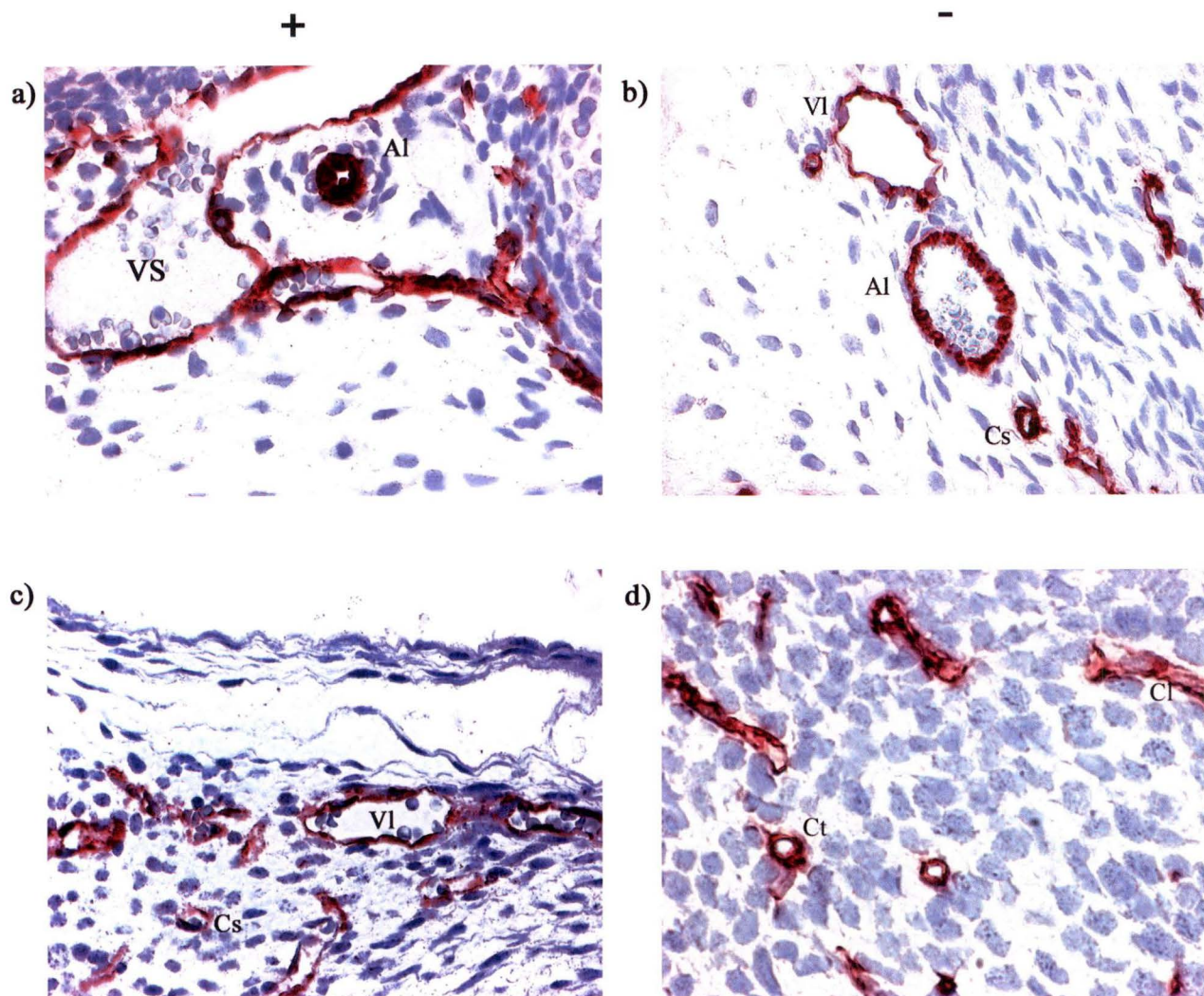


Figure 8. Marquage de cellules endothéliales d'embryons sauvage (+) et KOd2 (-)

- a) E16.5 sauvage. Coupe transversale d'artériole (400X)
- b) E14.5 KOd2. Coupes transversales de capillaire, artériole et veinule (400X)
- c) E16.5 sauvage. Coupes transversales de veinule et de capillaires sanguins (400X)
- d) E14.5 KOd2. Coupes transversales et longitudinales de capillaires (600X)

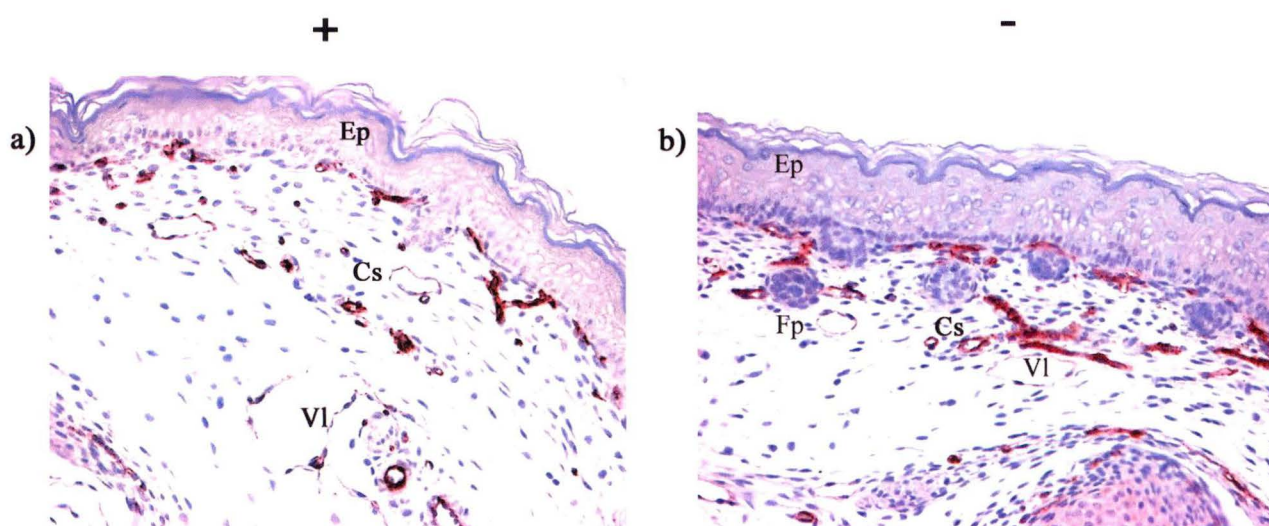


Figure 9. Marquage de cellules endothéliales de souris P0 sauvages (a) et KOd2 (b) (200X)

Al, artériole ; Cl, Coupe longitudinale ; Ct, Coupe transversale ; Cs, Capillaire sanguin ; Ep, Epithélium ; Fp, follicule pileux ; VI, veinule



### 3.2.2. Analyse des cellules musculaires lisses vasculaires

Afin de visualiser les cellules musculaires lisses, nous avons détecté, en immunohistochimie, l'isoforme de l' $\alpha$ -actine spécifique de ce type cellulaire.

L'étude des cellules musculaires lisses vasculaires est particulièrement intéressante car, au cours du développement embryonnaire, *Maged2* est fortement exprimé dans ce tissu dérivé du mésoderme.

Pour cette étude, nous avons sacrifié cinq portées. Les animaux déficients en *Maged2* ont été comparés à leurs frères sauvages. Les photographies illustrant ce travail ont été choisies de manière à être les plus représentatives des différents vaisseaux.

#### 3.2.2.1. Etude des cellules musculaires lisses embryonnaires [Figure 10 et 11]

Nous avons examiné l'intégrité des cellules musculaires lisses vasculaires d'embryons aux stades E14.5 et E16.5 sur des coupes sagittales.

Chaque type de vaisseaux est représenté chez l'animal déficient en *Maged2*. Nous pouvons aisément distinguer des vaisseaux de petit calibre (figure 11) et de moyen calibre (figure 10). Les systèmes veineux et artériels sont tous les deux présents. Les vaisseaux de même type sont marqués avec la même intensité et aucune anomalie ne peut distinguer le système circulatoire des animaux sauvages de celui des animaux mutés pour *Maged2*.

Les figures 10e et 10f montrent, à titre illustratif, les cœurs d'embryons sauvages et déficients en *Maged2*. Ces coupes ne passent pas au même niveau dans le cœur, la coupe 11f passe plus près de l'apex que la coupe 11e. Néanmoins, ces figures montrent que les cellules musculaires cardiaques sont marquées. Cela compromet l'examen des cellules musculaires lisses vasculaires du cœur.

#### 3.2.2.2. Etude des cellules musculaires lisses de nouveau-nés [Figure 12]

Nous avons observé les cellules musculaires lisses de souriceaux nouveau-nés. Comme pour l'analyse des cellules endothéliales, nous avons réalisé des coupes transversales dans des pattes d'animaux déficients pour *Maged2* et de leurs frères sauvages.

La figure 12 représente des vaisseaux de petit calibre (veinules et artérioles). Aucune anomalie n'a été observée chez l'animal muté sur les coupes que nous avons observées.

### **2.2.2.3. Discussion**

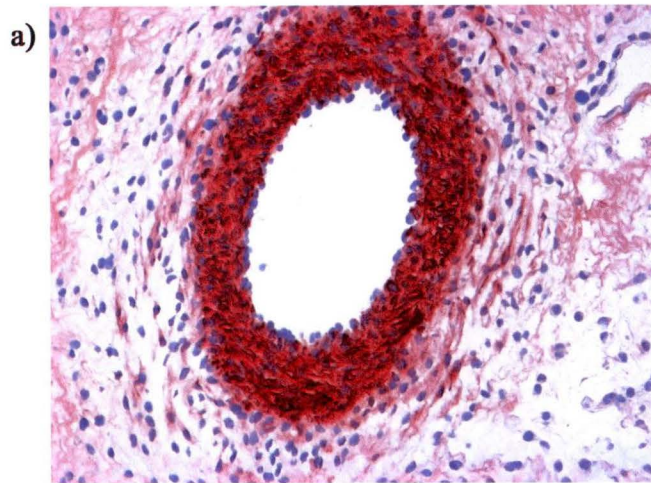
Le protocole utilisé pour mettre en évidence les cellules musculaires lisses vasculaires est au point pour les pièces de tissus de grande taille tels des coupes d'embryons entiers.

Les résultats obtenus pour l'étude immunohistochimique des cellules musculaires lisses sont semblables à ceux obtenus pour l'étude des cellules endothéliales. Aucune différence n'a été détectée entre les animaux sauvages et les animaux mutés au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires : chaque type de vaisseaux sanguins (de moyen calibre, de petit calibre et capillaires) est présent chez les individus sauvages et mutés. De plus, les vaisseaux comparables sont marqués avec la même intensité chez les animaux sauvages et déficients en *Maged2*.

A l'avenir, nous pourrions observer des souriceaux présentant le phénotype « pâle », sur des coupes transversales, afin de passer par les gros vaisseaux sanguins comme l'aorte.



+



-

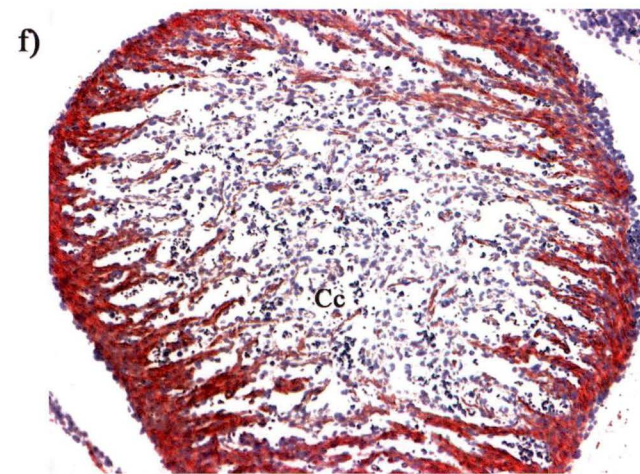
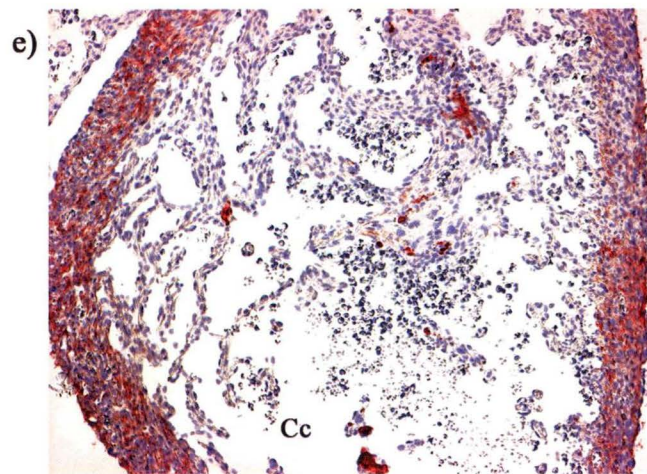
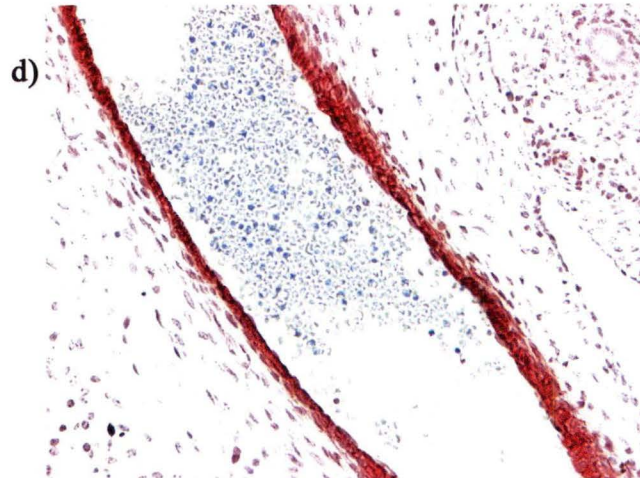
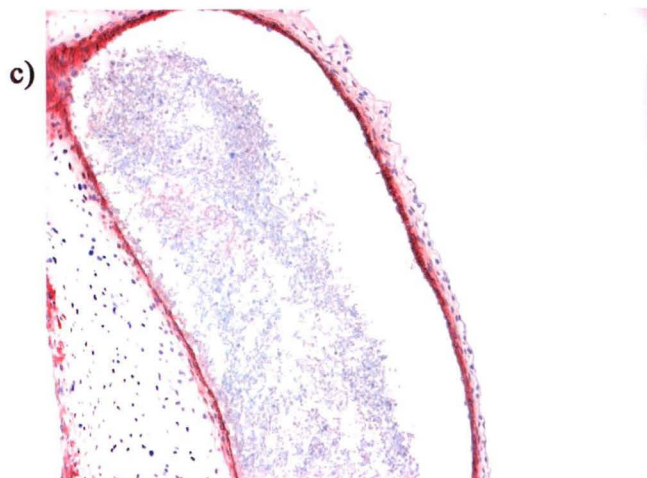
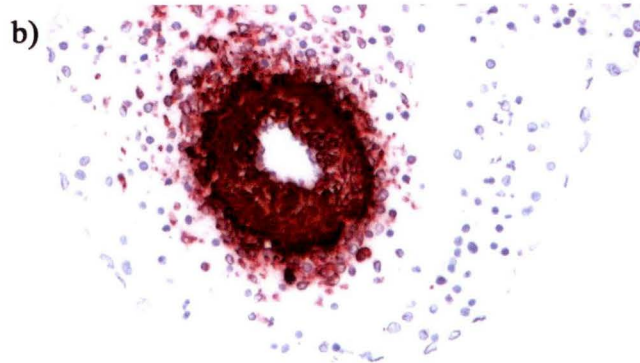


Figure 10. Marquage des cellules musculaires lisses d'embryons sauvages (+) et KOd2 (-).

- a) E16.5 sauvage. Coupe transversale d'artère (200X)    b) E16.5 KOd2. Coupe transversale d'artère (200X)  
 c) E16.5 sauvage. Coupe longitudinale de veine (100X)    d) E16.5 KOd2. Coupe longitudinale de veine (200X)  
 e) E14.5 sauvage. Coupe sagittale dans le coeur, cavité cardiaque (100X)  
 f) E14.5 KOd2. Coupe sagittale de coeur (100X)

Cc, cavité cardiaque.



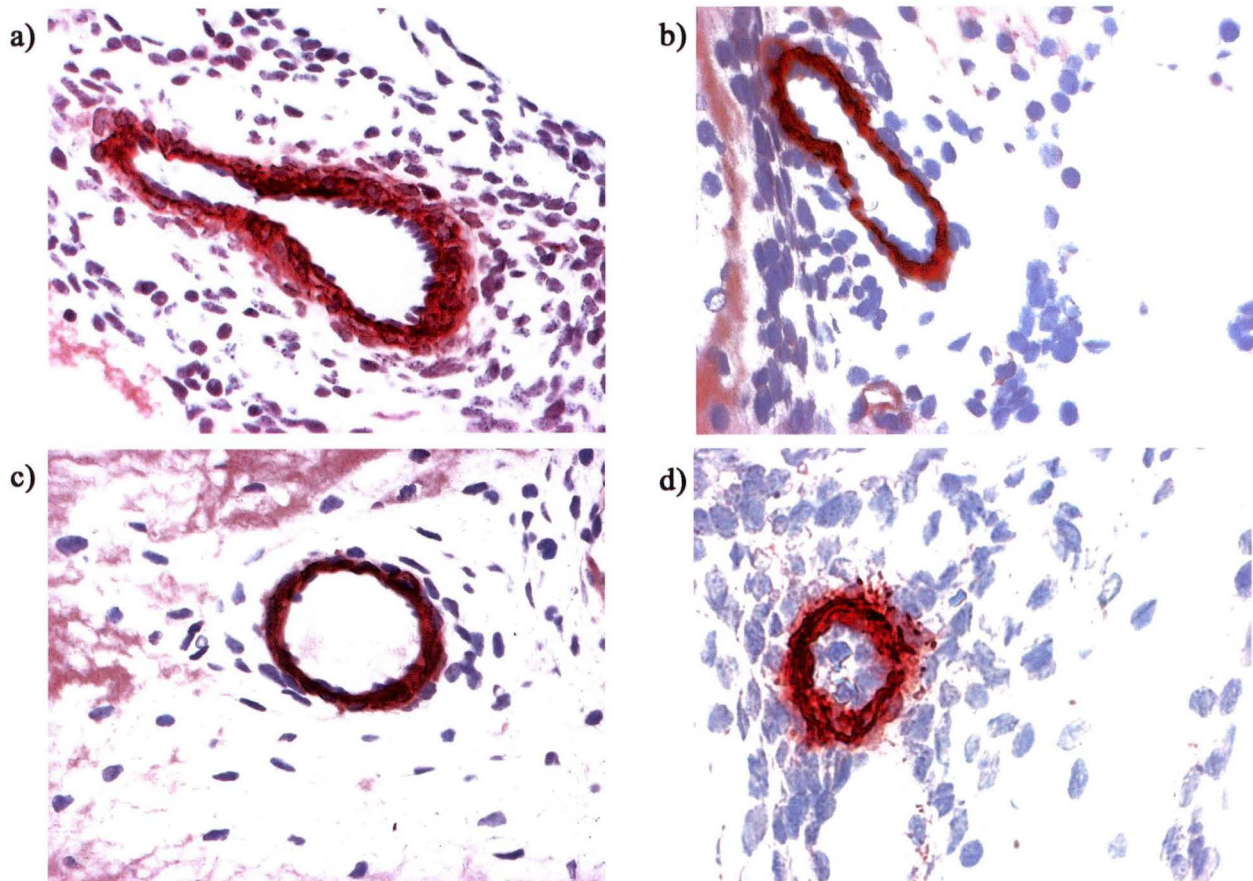


Figure 11. Marquage des cellules musculaires lisses d'embryons sauvages (+) et KOd2 (-)

- a) E16.5 sauvage. Coupe transversale de veinule (400X) b) E14.5 KOd2. Coupe transversale de veinule (400X)  
c) E16.5 sauvage. Coupe transversale d'artériole (400X) d) E16.5 KOd2. Coupe transversale d'artériole (600X)

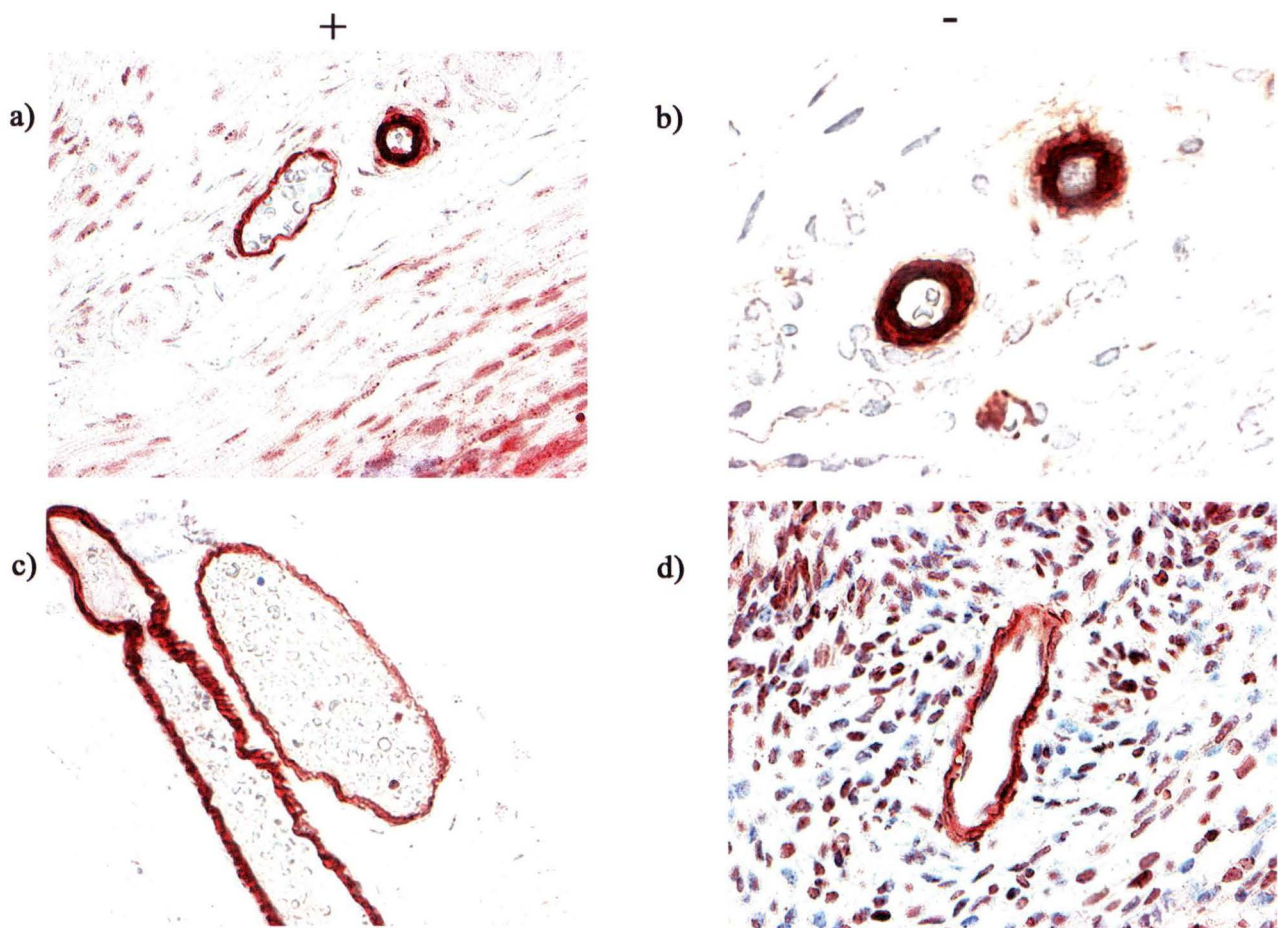


Figure 12. Marquage de cellules musculaires lisses de souris P0 sauvage (+) et KOd2 (-)

- a) P0 sauvage. Coupe transversale de veinule et artériole (400X) b) P0 KOd2. Coupes transversales d'artérioles (600x)  
c) P0 sauvage. Coupe longitudinale de veinules. (400X) d) P0 KOd2. Coupe transversale de veinule (400X)



#### 4. Conclusion et perspectives

Les souris C57/Bl6/J déficientes pour le gène *Maged2* présentent différents phénotypes. Une mortalité périnatale est clairement associée à la mutation. Elle se manifeste en fin de développement embryonnaire et continue à se manifester dans les 21 premiers jours suivant la naissance. La pénétrance de la mortalité est plus grande chez les souris C57/Bl6/J que chez les souris de l'élevage *Outbred*. Ensuite, certaines souris déficientes en *Maged2* sont atteintes d'hémorragies. Enfin, d'autres présentent une pâleur générale probablement due à une anémie.

A l'avenir, nous déterminerons le stade embryonnaire auquel la distribution mendélienne des génotypes n'est plus respectée. La viabilité des mâles mutés, endéans les 48 heures qui suivent la naissance, sera aussi étudiée. Pour cela, des embryons E19 seront génotypés directement après leur délivrance par césarienne. Ces souriceaux seront génotypés une deuxième fois 48 heures plus tard.

En microscopie optique, nous n'avons pu mettre en évidence aucune anomalie histologique clairement associée à l'absence d'un allèle *Maged2* fonctionnel.

Nous avons pu étudier un souriceau P0 déficient en *Maged2* présentant le phénotype « pâle ». Les tissus rénaux et cardiaques de ce nouveau-né présentaient un aspect plus lâche que le cœur et le rein de son frère sauvage. Cet aspect lâche pourrait être dû à une autolyse ou à un début de nécrose. L'autolyse aurait été causée par une fixation trop lente du tissu. La nécrose aurait débuté moins de 24 heures avant la fixation du tissu. En effet, après ce laps de temps, on aurait dû observer une inflammation caractérisée par l'envahissement des polymorphonucléaires dans la zone nécrosée. La pâleur de l'animal muté pourrait être due à une anémie. Dans ce cas, l'apport en oxygène des cellules serait réduit, ce qui pourrait expliquer la détérioration des cellules.

Pour toutes les autres observations, le système vasculaire des animaux mutés est semblable à celui des animaux sauvages.

Des études supplémentaires du profil d'expression de *Maged2* par l'hybridation in situ pourront renseigner sur les différents types cellulaires exprimant ce gène.

Nous pourrions également recommencer des colorations histologiques sur un plus grand nombre de nouveau-nés mutés présentant le phénotype « pâle » ou hémorragique. Il faudrait aussi améliorer la technique de fixation des tissus pour éliminer les problèmes éventuels d'autolyse tissulaire.

Des marquages des cellules endothéliales et musculaires lisses peuvent être poursuivis sur des coupes transversales d'animaux. Nous pourrions aussi examiner l'intégrité des vaisseaux de gros calibre. Pour approfondir l'étude des cellules endothéliales, des analyses quantitatives pourraient renseigner sur une différence potentielle de densité de vaisseaux sanguins chez les souris sauvages et mutées.

Des microanévrismes pourraient également être responsables des hémorragies des souris déficientes en *Maged2*, comme c'est le cas pour les souris déficientes en PDGFB. Des études supplémentaires sur l'intégrité des capillaires seraient donc nécessaires. L'injection de plaquettes rendues fluorescentes dans le système vasculaire des souris déficientes en *Maged2* pourrait renseigner sur des pertes de sang occultes (éventuellement responsable du phénotype « pâle » de certaines souris mutées) et, plus globalement, sur des fuites des éléments figurés du sang hors du système vasculaire.



Les deux causes principales d'hémorragies sont un problème d'intégrité vasculaire ou un problème d'hémostase.

L'absence d'expression de *Maged2* dans le foie, siège de l'hématopoïèse embryonnaire, nous orientait, dans un premier temps, vers une anomalie de l'intégrité vasculaire. Bien que nous n'ayons pas démontré d'anomalie vasculaire au cours de ce travail, cette possibilité est loin d'être exclue. Cependant, l'hypothèse d'un défaut de la cascade de coagulation est également ouverte et sera examinée en collaboration avec le docteur Jean-Etienne Fabre, de l'Institut de Génétique et de Biologie moléculaire et cellulaire d'Illkirch (France). Une technique de visualisation des plaquettes récemment mise au point par le Docteur Fabre permet l'observation du changement de forme caractéristique de leur activation et précédant leur agrégation. Cette technique est intéressante par rapport aux techniques classiques d'exploration de la fonction plaquettaire car elle ne nécessite que très peu de sang. Ainsi, nous saurons si les plaquettes provenant d'animaux déficients en *Maged2* répondent ou non aux agonistes testés et nous pourrons cerner une éventuelle anomalie de la fonction plaquettaire.

Si l'inactivation du gène *Maged2* affecte la cascade de coagulation, il se peut que les phénotypes pâles et hémorragiques soient liés. En effet, un défaut dans la cascade de coagulation serait responsable de spoliation sanguine, et par conséquent, d'anémie.

Chez les souris *Outbred*, les hémorragies sous-cutanées seraient un signe visible de cette spoliation : ces hémorragies seraient observables sur les embryons déficients en *Maged2* qui ont été moins bien protégés des traumatismes subis *in utero*. Si le phénotype est plus sévère chez les souris C57/Bl6/J que chez les souris de l'élevage *Outbred*, on peut concevoir que les embryons déficients en *Maged2* mourraient plus précocement. C'est pourquoi nous n'aurions observé que des nouveau-nés « pâles » à la naissance. Ces derniers seraient également anémiques à cause d'hémorragies qui seraient, dans ce cas, non apparentes et moins importantes. Il s'agirait d'hémorragies internes, par exemple, des hémorragies au niveau du système digestif. Cette dernière hypothèse devrait être vérifiée par la détection de sang dans le liquide amniotique d'embryons déficients en *Maged2* ou dans les fèces de nouveau-nés mutés.



# **Matériel et méthodes**

## 1. Elevage des souris

Les grossesses des souris sont contrôlées par la présence de *plugs* vaginaux. Le jour du *plug* est appelé *jour embryonnaire 0.5* (E 0.5).

Les souris sont tuées par dislocation cervicale après anesthésie profonde au diéthyl éther.

Les embryons sont tués par décapitation. Leur cœur et leurs reins sont prélevés et fixés directement dans le Bouin ou le PFA. Les embryons qui sont fixés en entier sont tués par désensibilisation dans la glace. Leur fixation nécessite un dépiautage s'ils sont âgés de plus de 16 jours.

## 2. Génotypage des souris

### 2.1. Extraction d'ADN des queues de souris

Prélever des fragments de queues d'environ 5 mm et les mettre dans 150 µl de tampon de lyse.

Chauffer 5 minutes à 95°C. Centrifuger 10 min à 10000 rpm. Ajouter 15 µl de protéinase K à 10 mg/ml. Vortexer et centrifuger 10min. à 10000 rpm.

Incuber O/N à 50°C.

Chauffez 5min. à 95°C. Centrifuger 20min. à 5000 rpm.

Engager 1 µl par PCR de 25µl.

### 2.2. PCR

H <sub>2</sub> O	13.25µl
Tampon 10X <sub>biotools</sub>	2.5µl
Oligo 1 (10µM)	2.5µl
Oligo 2 (10 µM)	2.5 µl
dNTP (2mM)	2.5µl
Taq polymérase <sub>biotools</sub>	0.75µl
ADN	1µl

Cycle :	3 min. à 94°C	30 X
	45 sec. à 94°C	
	45sec. à 57°C	
	45sec. à 72°C	

#### Matériel :

Tampon de lyse 10X : 100mM Tris-HCl PH 8.0 ; 500mM KCl ; 1% triton X100.

Taq polymérase et tampon 10x : biotools



*Pour la détermination de l'allèle muté :*

- Oligo PCHO 82 = 5'-TTC-TTT-GAT-GAT-GTC-CTT-CAG-3'
- Oligo PCHO 96 = 5'-CTT-GGT-GAA-GTA-CCT-GTT-GGC- 3'

- Et
- Oligo ODB 174 = 5'-CGA-GGA-ATT-CTC-TGACAC-AAG-CGA- GAG-TGG-3'
  - Oligo ODB 176 = 5'-CCT-GAA-TTC-GAC-GCT-GTG-ATT-ATT-GC-3'

*Pour la détermination du sexe :*

- Oligo Zfy 11 = 5'-GTA-GGA-AGA-ATC-TTT-CTC-ATG-CTG-3'
- Oligo Zfy 12 = 5'-CTT-TTG-AGT-GCT-GAC-GGG-TGA-CGG-3'

Principe :

*Pour la détermination du sexe :*

Le sexe est déterminé grâce à l'amplification d'une séquence de 200 bp (ZFY) située sur le chromosome Y (**Figure** ).

Zfy 11 et Zfy 12



**Figure 1. PCR sur de l'ADN de souriceaux P0 issus de croisements entre des femelles +/- et des mâles WT. Détermination du sexe par amplification d'un gène spécifique au chromosome Y. Le marqueur moléculaire de 100bp se trouve à gauche. Le gène ZFY est amplifié chez les souris 4, 5 et 6, ce sont des mâles. (-) représente le contrôle négatif.**

*Pour la détermination de l'allèle sauvage :*

Les amorces PCHO 96 et PCHO 82 amplifient un fragment d'environ 340 bp situé sur les exons 5 et 6 du gène *Maged2*. Ces exons ont été éliminés chez les souris KO pour ce gène (**Figure 2 et 3**).

*Pour la détermination de l'allèle muté :*

Les amorces ODB 174 et ODB 176 reconnaissent des séquences situées sur les exons 2 et 13. Chez les souris mutées pour le gène *Maged2*, seuls les exons 1, 2 et 13 sont encore présents. De ce fait, on amplifie un fragment d'environ 300bp chez l'animal muté, par contre, chez l'animal sauvage le fragment est trop grand pour être amplifié (**Figure 2 et 3**).

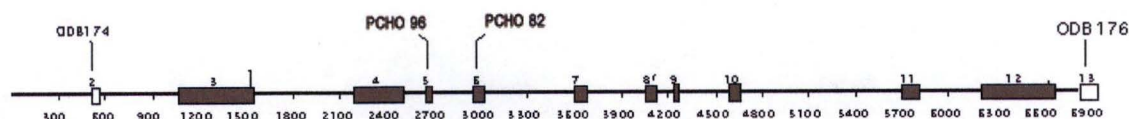


Figure 2. Organisation génomique du gène *Maged2*. Les exons gris sont éliminés dans l'allèle mutant. Les amorces utilisées sont indiquées au-dessus des exons.

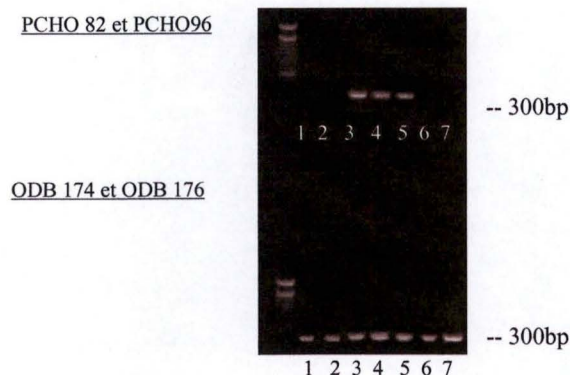


Figure 3. PCR sur l'ADN de souriceaux P0 issus de croisement entre des mâles sauvages et des femelles hétérozygotes permettant la détection de la mutation d2. Les amorces ODB 174 et ODB 176 amplifient un fragment correspondant à l'allèle muté et les amorces PCHO 82 et PCHO 96 amplifient un fragment génique caractéristique de l'allèle sauvage. Les souris 1, 2, 6 et 7 sont des mâles mutés et les souris 3, 4 et 5 sont des femelles hétérozygotes. Le marqueur moléculaire de 100bp se trouve à gauche.

### 3. Techniques histologiques

#### 3.1. Préparation des tissus

Prélever le tissu ou la pièce souhaitée. Fixer le tissu dans du Bouin (minimum 24h) pour les colorations histologiques à l'HES ou dans du paraformaldéhyde (PFA) 4%, pendant 24h, pour les marquages immunohistochimiques.

Imprégner les tissus : 3 bains d'une heure dans le méthanol, 3 bains d'une heure dans le toluène et 3 bains d'une heure dans la paraffine (*Shandon Elliott Duplex*).

Enrober les échantillons en paraffine avec l'*histocentre* (shandon).

#### Matériel :

Bouin: mélange de 10 ml de formoline 40%, 5 ml d'acide acétique glacial et 85 ml d'acide picrique

PFA : dissoudre la PFA (4% du volume total) dans un volume d'eau distillée égal aux 9/10 du volume total chauffé au préalable à 60°C. Ajouter une à deux gouttes de NaOH 10N ; la solution devient transparente presque instantanément. Laisser refroidir à température ambiante. Porter à pH 7.4 grâce à de l'HCl



### 3.2. Microtomisation

Dégrossir le bloc. Laisser entre 6 et 12h dans du *Molifex*.

Couper le bloc en rubans d'une épaisseur de 6  $\mu$ m.

Choisir les coupes d'intérêt. Poser sur des lames avec de l'eau gélatineuse. Les lames doivent être silanées pour les marquages immunohistochimiques. Chauffer environ 1min. à 54°C ; égoutter les lames et les sécher à l'aide d'un papier buvard ; Chauffer pendant environ 1min. et entreposer dans une étuve à 48°C pendant une heure minimum.

#### Matériel :

Eau gélatinée: 1 g à dissoudre dans 80 ml d'eau. Filtrer.

Moliflex: Prod 360584X (BDH).

### 3.3. Coloration Hémalun, Erythrosine, Safran

Déparaffiner et hydrater :

2x3min. dans du toluène

2 x3min. dans du méthanol 100%

3min. dans du méthanol 70%

10min. sous l'eau courante

#### Coloration

a) *Coloration des noyaux :*

7min. dans de l'hémalun

rinçage dans l'eau

1min. dans de l'éthanol-HCl

b) *Coloration du cytoplasme :*

6min. dans de l'érythrosine

rinçage dans l'eau

1min. dans de l'éthanol 70%

c) *Coloration du tissu conjonctif :*

2x1min. dans de l'isopropanol absolu

8min. dans une solution éthanolique de safran

3x1min. dans de l'isopropanol absolu

3 passages dans le toluol

#### Montage

Montage des coupes encore imbibées de toluol avec du DPX (liquide montage permanent).

Mettre sur marbre avec un poids au-dessus du couvre-objet pour le durcissement du DPX.

### Matériel

-Hémalum : Porter à ébullition 1L d'une solution saturée d'alun de potassium (Merk 1047) dans de l'eau distillée. (AlK<sub>0</sub>8S<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O). A jouter, hors du feu, 3 g d'hématein Standard Fluka. Faire bouillir 5min. Refroidir. Filtrer et ajouter 20ml d'acide acétique glacial (Merk 60). Toujours filtrer avant emploi.

-Erythrosine : 1000 ml d'eau courante; 2 g d'érythrosine (Merck 1355); 10 gouttes de formol.

-Safran : 1L d'alcool éthylique absolu; 5 g Safran du gatinais (Chroma). Faire bouillir 1 heure avec une colonne réfrigérante. Refroidir. Filtrer. Diluer 1/1 avec de l'alcool absolu avant l'emploi.

-Alcool-HCl : 100 ml d'alcool éthylique 95° dénaturé à l'éther; 0,4 ml HCl fumant (Merck 317).

DPX: Prod 36029 (BDH).

### **3.4. Marquage des cellules endothéliales grâce à un anticorps anti-CD-31**

Déparaffiner (voir point 2.3)

Mettre dans du TBS.

Incuber 1h dans la trypsine à 37°C en chambre humide

Rincer 3x5min. dans du TBS

Inhiber les peroxydases endogènes : laisser 20min. dans de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% à RT en chambre humide

Rincer 3x5min. dans du TBS

Incuber 45min. dans du TNB à RT (Renaissance kit, NEN Life Science Products, TSA indirect for immunochemistry, NEL 700)

Incuber l'anticorps primaire pendant 2h à RT en chambre humide (MEC 13.3, dil. BD/pharmingen ref.557355 1/500 dans du TNB).

Rincer 3x5min. dans du TBS.

Incuber l'anticorps secondaire 45min. à RT en chambre humide (anticorps de lapin anti-rat biotinylé, dil.1/300 dans du TNB).

Rincer 3x5min. dans du TBS

Incuber la streptavidine-peroxydase 30min. à RT en chambre humide (dil. 1/100 dans du TNB).

Rincer 3x5min. dans du TBS

Incuber la biotine 8min. à RT en chambre humide (dil 1/50 dans la solution d'amplification).

Rincer 3x5min. dans du TBS

Incuber la streptavidine-peroxydase 30min. à RT en chambre humide (dil. 1/100 dans du TNB).

Rincer 2x5min. dans du TBS

Révéler avec du substrat chromogène prêt à l'emploi (AEC<sup>+</sup>): mettre une goutte sur chaque coupe, laisser environ 4min. en suivant le marquage au microscope, rincer dans l'eau distillée.

Contrecolorer à l'hémalum



## Montage

Monter les coupes au glycergel sans les laisser sécher

Mettre sur marbre avec un poids au-dessus du couvre-objet pour le durcissement du glycergel.

### Matériel

TBS : tris 0,01M, NaCl 0.9%, Triton X-100 0.1% pH 7.6

Trypsine : Trypsine 2% dans une solution 0.1% CaCl<sub>2</sub>

Le kit « Renaissance TSA indirect » (Perkin Elmer) contient : la streptavidine-péroxydase, la biotine tyramide, le blocking reagent.

TNB : 0.1M tris-HCl pH 7.5

0.15M NaCl

0.5% blocking reagent.

AEC<sup>+</sup> (DakoCytomation K3461)

## 3.5. Marquage des cellules musculaires lisses grâce à un anti-corps anti- $\alpha$ actine

Déparaffiner (voir point 2.3)

Mettre dans du PBS.

Incuber 1h dans la trypsine à 37°C en chambre humide

Rincer 3x5min. dans du PBS

Inhiber les peroxydases endogènes : laisser 20min. dans de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% à RT, en chambre humide

Rincer 3x5min. dans du PBS

Incuber 30min. dans du PBS/BSA

Incuber l'anticorps primaire 2h à RT en chambre humide (Sigma clone 1A4, Dil.1/2000)

Rincer 3x5min. avec du PBS/BSA

Incuber l'anti-corps secondaire 1h à RT en chambre humide (anticorps de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase dil : 1/100).

Rincer 3x5min. avec du PBS/BSA

Révéler avec du substrat chromogène prêt à l'emploi (AEC<sup>+</sup>) : mettre une goutte sur chaque coupe, laisser environ 4min. en suivant le marquage au microscope, rincer dans l'eau distillée.

Contrecolorer à l'hémalun.

## Montage

Monter les coupes encore au glycergel sans les laisser sécher

Mettre sur marbre avec un poids au-dessus du couvre-objet pour le durcissement du glycergel.

### Matériel

Hémalun : *cfr coloration HES*

AEC<sup>+</sup> : *cfr marquage au CD31.*

## **4. Western Blot**

### **4.1. Lysats protéiques et SDS PAGE**

Disséquer les organes sur glace.

Peser et homogénéiser avec un dounce dans 10 volumes de RIPA et un inhibiteur de protéases.

Centrifuger 10min. à 10000xg à 4°C. Congeler les lysats obtenus à -70°C.

Utiliser 20µl de lysat par piste. Dénaturer l'échantillon et un volume équivalent de bleu-DTT pendant 5min. à 100°C et charger 40 µl sur le gel d'acrylamide SDS 8% (15 cm/15cm).

Faire migrer pendant 3h à 100V

### **4.2. Transfert**

Laisser le gel entre les 2 plaques de verre.

Tremper la membrane PVDF (Hybond-P de Amersham Biosciences) dans du méthanol pendant 1min. La rincer plusieurs fois dans l'eau puis dans la solution "Anode I".

Venir la mettre sur le gel qui se trouve sur la plaque de verre.

Tremper 3 papiers Wathman dans la solution "Anode I". Les mettre sur la membrane.

Passer une pipette sur le montage pour retirer l'excès de solution et de bulles.

Tremper 3 papiers Wathman dans la solution "Anode II". Les mettre sur le montage.

Passer une pipette sur le montage pour retirer l'excès de solution et de bulles.

Retourner le montage et tremper 3 papiers Wathman dans la solution "Cathode". Les mettre sur le gel.

Passer une pipette sur le montage pour retirer l'excès de solution et de bulles.

Venir mettre le montage avec les papiers "Cathode" vers le haut dans l'appareil. La cathode de l'appareil se trouvant sur le couvercle.

Fermer le tout et brancher l'appareil sur 130mA pendant 30min. (pour papiers Wathman 15/15).

### **4.3. Révélation**

Incuber la membrane dans 25 ml de solution de blocage pendant une heure à RT.

Laver 2 fois 5min. avec de l'eau milliQ.

Incuber la membrane dans 15 ml de tampon de dilution avec l'anticorps primaire. Agiter O/N à 4°C.

Laver 2 fois 5min. avec de l'eau milliQ.

Incuber la membrane dans le tampon de dilution avec l'anticorps secondaire. Agiter pendant une heure à RT.

Laver 2 fois 5min. avec de l'eau milliQ. Laver 1 fois 5min. avec 15 du TBS.



Révéler la présence de protéines selon les instructions du kit *super signal west pico*.

Matériel:

RIPA: 50mM Tris pH8; 150 mM NaCl; 0,5% Na Deoxycholate; 0,1% SDS; 1% NP40.

Protéase inhibitor cocktail tablets: Complete<sup>TM</sup> Mini (Roche). 1 pastille à dissoudre dans 1,5 ml d'eau stérile.

Gel de résolution 8% (pour 20 ml): 9,3 ml H<sub>2</sub>O; 5,3 ml 30% acrylamid mix; 5,0 ml 1,5M Tris (pH 8,8); 0,2 ml 10% SDS; 0,2 ml 10% ammonium persulfate; 0,024 ml TEMED.

Stacking gel (5ml): 3,4 ml H<sub>2</sub>O; 0,83 ml 30% acrylamid mix; 0,63 ml 1,0M Tris (pH 8,8); 0,05 ml 10% SDS; 0,05 ml 10% ammonium persulfate; 0,010 ml TEMED.

Bleu-DTT: 800 ul de bleu (100mM Tris HCl pH6,8; 4% SDS; 0,2% Bromophénol blue; 20% glycérol) + 200 ul de DTT.

Anode I: 30mM Tris Base (3,63 g/l); 10% méthanol.

Anode II: 300mM Tris Base (36,3 g/l); 10% méthanol.

Cathode: 25mM Tris Base (3,03 g/l); 40mM Aminoheptane acid (5,25 g/l); 10% méthanol; 0,01% SDS.

Solution de blocage: 4% de lait en poudre dans du TBST.

AC primaire: AC anti-MAGED2/NRAGE-Like 2b de lapin (#07-297 Upstate) 1/2000 dans solution de blocage ou AC monoclonal anti- $\beta$ -actin (A 5316 Sigma) 1/1000 de souris dans solution de blocage.

AC secondaire: HRP-AC anti-lapin de chèvre 1/1000 dans solution de blocage et HRP-AC anti souris de chèvre 1/1000 dans solution de blocage.

TBS: pour 1L 10X TBS: 24,2 g Tris base; 80 g NaCl; ajuster à pH 7,6 avec de HCl

TBST: 1X TBS, Tween 20 (Sigma) 1/1000.

Substrat chemoluminescent: SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate(PIERCE).

# **Références bibliographiques**



Atlas digital de morphologie microscopique du Département Histologie-Embryologie des FUNDP

Barker PA, Salehi .

The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J Neurosci Res.* **67**,705-712 (2002)

Bertrand M, Huijbers , Chomez, De Backer.

Comparative Expression Analysis of the *MAGED* genes During Embryogenesis and Brain Development. *Developmental dynamics* **230**, 325-334 (2004)

Bischof JM, Ekker , Wevrick .

A MAGE/NDN-like gene in zebrafish. *Dev Dyn.* **228**, 475-479 (2003)

Carmeliet P, Ferreira, Breier, Pollefeyt, Kieckens, Gertsenstein, Fahrig, Vandenhoek, Harpal, Eberhardt, Declercq, Pawling, Moons, Collen, Risau, Nagy.

Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-439 (1996)

Chomez P, Williams R, De Backer O, Boon T, Vennstrom B.

The SMAGE gene family is expressed in post-meiotic spermatids during mouse germ cell differentiation. *Immunogenetics* **43**, 97-100 (1996)

Chomez P, De Backer, Bertrand, De Plaen, Boon, Lucas.

An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* **61**, 5544-5551 (2001)

Clotman F, De Backer, De Plaen, Boon, Picard.

Cell- and stage-specific expression of mage genes during mouse spermatogenesis. *Mamm Genome.* **11**, 696-699 (2000)

De Smet C, De Backer, Faraoni, Lurquin, Brasseur, Boon.

The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci* **93**, 7149-7153 (1996)

De Plaen E, Arden, Traversari, Gaforio, Szikora, De Smet, Brasseur, van der Bruggen, Lethe, Lurquin, et al.

Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* **40**, 360-9 (1994)

Frade JM.

NRAGE and the cycling side of the neurotrophin receptor p75. *Trends in Neurosciences* **23**, 591-592 (2000)

Ferrara, Carver, Moore, Chen , Dawd, Lu, Sue O'Shea, Powell, Braxtar, Kenneth Hillan, March W Moore.

Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439-442 (1996)

- Gartner, Leslie P., Hiatt, James L., Lacave, Roger, *Atlas en couleur d'histologie*, Ed. Pradel, Paris, 1997, pp.300-309.
- Huang LQ, Brasseur, Serrano, De Plaen, van der Bruggen, Boon, Van Pel.  
Cytolytic T lymphocytes recognize an antigen encoded by MAGE-A10 on a human melanoma. *J Immunol* **162**, 6849-6854 (1999)
- Jordan B. M., Dinev, LeMellay, Troppmair, Götz, Wixler, Sendtner, Ludwig, R. Rapp.  
Neurotrophin Receptor-interacting Mage Homologue Is an Inducible Inhibitor of Apoptosis Protein-interacting Protein That Augments Cell Death. *J. Biol. Chem* **276**, 39985 - 39989 (2001)
- Leveen P, Pekny, Gebre-Medhin, Swolin, Larsson, Betsholtz.  
Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* **8**, 1875-1887 (1994)
- Lindahl P, Johansson, Leveen, Betsholtz.  
Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**, 242-245 (1997)
- Longpré bernard, *Les anémies*, Ed. Masson, Paris, 1994
- Lucas, De Smet, Arden, Viars, Lethe, Lurquin, Boon.  
Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res.* **58**, 743-752 (1998)
- Lucas S, Brasseur, Boon.  
A new MAGE gene with ubiquitous expression does not code for known MAGE antigens recognized by T cells. *Cancer Res.* **59**, 4100-4103 (1999)
- Lucas S, De Plaen, Boon.  
MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. *Int J Cancer* **87**, 55-60 (2000)
- Muscatelli F, Abrous, Massacrier, Boccaccio, Le Moal, Cau, Cremer.  
Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet.* **9**, 3101-3110 (2000)
- Matsumoto K., Taniura, Uetsuki, Yoshikawa.  
Necdin acts as a transcriptional repressor that interacts with multiple guanosine clusters. *Gene* **272**, 173-179 (2001)
- Mehta, Atul B., Hoffbrand, A. Victor, Rocour, Michel, Bosly, André, *Hématologie*, De Boeck, Bruxelles, 2003
- Muscatelli F, Walker, De Plaen, Stafford, Monaco.  
Isolation and characterization of a MAGE gene family in the Xp21.3 region. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 4987-4991 (1995)
- Pold M, Zhou, Chen, Hall, Vescio, Berenson.



- Identification of a new, unorthodox member of the MAGE gene family. *Genomics* **59**, 161-167 (1999)
- Rosen ED, Chan, Idusogie, Clotman, Vlasuk, Luther, Jalbert, Albrecht, Zhong, Lissens, Schoonjans, Moons, Collen, Castellino, Carmeliet.  
Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. *Nature* **390**, 205-318 (1997)
- Saburi S, Nadano, Akama, Hirama, Yamanouchi, Naito, Tojo, Tachi, Fukuda.  
The trophinin gene encodes a novel group of MAGE proteins, magphinins, and regulates cell proliferation during gametogenesis in the mouse. *J Biol Chem* **276**, 49378-49389 (2001)
- Salehi AH, Roux, Kubu, Zeindler, Bhakar, Tannis, Verdi, Barker.  
NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron*. **27**, 279-288 (2000)
- Salehi AH, Xanthoudakis, Barker.  
NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J Biol Chem*. **277**, 48043-54800 (2002)
- Soriano P.  
Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev*. **8**, 1888-1896 (1994)
- Taniura H, Taniguchi, Hara, Yoshikawa.  
Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1. *J Biol Chem*. **273**, 720-8 (1998)
- Taniura H, Matsumoto, Yoshikawa.  
Physical and Functional Interactions of Neuronal Growth Suppressor Necdin with p53. *J Biol Chem*. **274**, 16242-16248 (1999)
- Tsai TF, Armstrong D, Beaudet AL.  
Necdin-deficient mice do not show lethality or the obesity and infertility of Prader-Willi syndrome. *Nat Genet*. **22**, 15-16 (1999)
- van der Bruggen P, Traversari, Chomez, Lurquin, De Plaen, Van den Eynde, Knuth, Boon.  
A Gene Encoding an Antigen Recognized by Cytolytic T Lymphocytes on a Human Melanoma. *Science, New Series* **254**, 1643-1647 (1991)
- van der Bruggen P, Zhang, Chaux, Stroobant, Panichelli, Schultz, Chapiro, Van den Eynde, Brasseur, Boon.  
Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunological Reviews* **188**, 51 (2002)

Xue J, Wu Q, Westfield LA, Tuley EA, Lu D, Zhang Q, Shim K, Zheng X, Sadler JE.  
Incomplete embryonic lethality and fatal neonatal hemorrhage caused by prothrombin  
deficiency in mice. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 7603-7607 (1998)

Ylikorkala A, Rossi, Korsisaari, Luukko, Alitalo, Henkemeyer, Makela.  
Vascular abnormalities and deregulation of VEGF in Lkb1-deficient mice. *Science* **293**,  
1323-1326 (2001)

Yoshikawa K.  
Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons. *Neurosci Res.* **37**, 1-14  
(2000)

Zhu J, Motejlek K, Wang D, Zang K, Schmidt A, Reichardt LF.  
beta8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Development*  
**129**, 2891-2903 (2002)